

BIOTECNOLOGIA

La biotecnologia è una scienza in grado di dare risposte nuove e soprattutto sostenibili, va ad impattare in modo pesante l'economia più sostenibile (green economy). È una tecnologia che ha a che fare con un microorganismo (batteri, funghi, lieviti) per sintetizzare, rompere o trasformare materiali.

La biotecnologia non è la microbiologia, quest'ultima si occupa delle cellule microbiche e dei microorganismi, studia le reazioni che avvengono all'interno della cellula mentre la biotecnologia è un'industria, impatta e ha a che fare con cose vive, è qualcosa che ha a che fare con la produzione. Noi faremo biotecnologia, non microbiologia.

La biotecnologia non è neppure biologia, qui la differenza sostanziale è la scala di operazione.

Nei processi biotecnologici siamo legati alla tracciabilità, se il microorganismo cambia/muore bisogna spegnere il reattore.

Nel caso delle biotecnologie il reattore è il posto in cui metto il microorganismo (considerato il vero reattore) e dove faccio avvenire la reazione. Vogliamo mantenere vivo per il tempo richiesto questo microorganismo.

Le condizioni operative dipendono dalle cellule che stiamo utilizzando.

La produzione biotecnologica usa fermentatori giganteschi dove ho principalmente acqua, prodotto fermentato e infine ho il prodotto in sé che però è molto poco. La maggior parte dei costi di un processo biotecnologico è dato dal fatto che abbiamo molte cose diluite, molte cose simili e soprattutto tante.

Il più delle volte lavoriamo con tutte e tre le fasi: solido il reattore, liquido il substrato e poi c'è la fase gassosa (degradando il substrato spesso si generano gas).

La biotecnologia usata nel modo corretto può fare un salto di qualità dal punto di vista industriale e ambientale.

Uno dei grossi problemi è la ricerca del substrato meno costoso, il substrato è uno dei pochi margini su cui possiamo lavorare per ridurre i costi. Dobbiamo dunque andare a cercare uno scarto di un'industria che può essere utilizzato modificandolo oppure così come è.

Un altro problema è quello della asepsi, quando mettiamo il nostro organismo nel reattore vogliamo che ci sia solo lui, vogliamo evitare che ci siano altre presenze che magari possono essere cannibali, questo problema è legato alla sterilizzazione. Per sterilizzare dobbiamo andare a T alte ma dentro al reattore devo lavorare a T sui 30 °C.

Per sterilizzare l'aria posso filtrarla, l'aria va alimentata di continuo e aldilà dei costi del pompaggio devo considerare anche costi di filtrazione.

Le reazioni microbiologiche sono più controllate (controllo l'enzima e dunque controllo la cellula).

Si opera sempre per cascate di reazioni: ogni passaggio può essere controllato.

Il microorganismo non vuole far altro che vivere, riprodursi e colonizzarsi nell'ambiente in cui si trova. Per questa ragione produrrà ciò che gli serve per sopravvivere solo nelle quantità adatte (esempio acido citrico nel ciclo di Krebs).

La microbiologia è divisa in sotto-discipline: bianca → cibo, rossa → medicale e verde → ambiente e ecologia.

Da un punto di vista industriale l'uso di un microorganismo per rimpiazzare procedure già esistenti può rendere alcune industrie più efficienti, ecologiche e sostenibili in quanto lo scarto sarebbe ridotto, il consumo dell'energia e l'emissione di gas si abbasserebbero e si utilizzerebbero materiali più rinnovabili.

Obiettivo: fare stessi prodotti utilizzando percorsi diversi, utilizziamo spesso gli **enzimi** ossia i catalizzatori biologici, fanno avvenire le reazioni e otteniamo così prodotti puliti e targettati in quanto con gli enzimi siamo in condizioni di zero waste, vantaggio: uso di condizioni molto blande come T e P amb ma anche una catalisi estremamente mirata. Gli enzimi sono degli ottimi catalizzatori che un tempo venivano utilizzati principalmente per l'industria farmaceutica e alimentare mentre ora vanno ad impattare su altri tipi di produzione industriali come ad esempio i jeans strappati o lo sbiancamento della carta. La catalisi enzimatica sta diventando sempre più importante.

Molti microorganismi vengono prodotti per fare gli enzimi.

L'enzima è una proteina macroscopica molto complessa che si estrae dal microorganismo (→ pacchetto proteico perché il 50% della cellula è fatta da proteine).

La principale differenza tra enzimi e catalizzatori convenzionali è data dalle condizioni operative: gli enzimi possono lavorare a P e T ambiente. Si lavora a queste condizioni poiché si riducono i costi ma soprattutto per la cellula, infatti l'enzima nasce per operare all'interno della cellula la quale lavora solitamente a queste condizioni (poi però molte cellule si sono adattate a tantissimi habitat diversi come ad esempio il vulcano).

Noi siamo degli organismi chirali, i nostri enzimi sono in grado di riconoscere soltanto una certa tipologia di posizione nello spazio → tutte le molecole biologiche hanno delle strutture biologiche definite.

Esistono gli ENANTIOMERI: due molecole identiche ma speculari.

Gli enzimi trasformano uno solo dei due enantiomeri e noi riusciamo a riconoscerne solo uno.

Un altro obiettivo della biotecnologia è quella di produrre il microorganismo stesso per farlo lavorare oppure per fare reazioni chimiche.

La biotecnologia è dedicata anche alla modifica del patrimonio genetico.

OGM=organismo geneticamente modificato all'interno non della stessa specie, l'accezione è data a quelli transgenici (l'organismo non avrebbe mai prodotto quella proteina). Spesso all'interno del reattore uso i mutanti, li genero usando dei sistemi che possono portare a modifiche del DNA.

FERMENTAZIONE: la fermentazione deve essere utilizzata con organismi, non ha senso applicarlo ad un processo enzimatico. Fermentazione sinonimo di bioprocesso.

1) Nella fisiologia microbica la fermentazione riguarda metabolismi di fonte di carbonio dove l'energia è generata dalla fosforilazione del livello di substrato e dove le molecole organiche sono gli accettori finali degli elettroni generati durante le redox.

Quando l'accettore finale è un composto inorganico si parla di *respirazione*: aerobica se l'accettore è l'ossigeno, anaerobica se è un'altra molecola inorganica.

2) Per l'industria microbiologica la fermentazione è un processo dove i microorganismi sono cresciuti su una larga scala anche se l'accettore finale degli elettroni non è un composto organico. Quindi la produzione di penicillina e la crescita delle cellule del lievito, entrambe altamente aerobiche, sono indicate come fermentazioni come produzione di etanolo o bevande alcoliche, cioè fermentazioni in senso fisiologico.

3) Per i processi food, la fermentazione implica quei processi alimentari (burro, vino, birra ecc) che utilizzano un microorganismo (o enzimi) che gioca un grande ruolo. I microorganismi determinano la natura del cibo producendo i componenti aromatici e decidendo le proprietà organolettiche generali del cibo.

Il vino è ottenuto dalla fermentazione alcolica, l'obiettivo di questa fermentazione non è la produzione di etanolo in sé ma il sapore e di avere tutte quelle molecole tipo aldeidi e chetoni che danno la caratteristica del vino.

BIOPROCESSO

Visione generale del bioprocesso: partiamo da una richiesta del mercato (una necessità, antibiotici per morte di polmonite; vaccini per morbillo ecc) dopodiché bisogna selezionare l'organismo che determinerà la scelta del reattore. I microorganismi utilizzati nell'industria non sono MAI quelli naturali ma sono manipolati adattandoli affinché possano massimizzare la produzione e allungare i tempi diminuendo i costi. Il costo è comunque legato all'obiettivo che sto facendo, ad esempio se posso trovare cura al covid per sempre ci può stare che sia un po' costoso.

Aggiungo o sottraggo poi aria: normalmente calcolo cosa devo ossidare, apro il reattore, metto la sostanza da ossidare, metto dentro l'ossigeno calcolato per ossidarla, chiudo, scaldo se serve e così faccio avvenire la reazione ma questo procedimento non posso farlo in biotecnologia. Non posso poiché la pressione caratteristica di questi processi è quella della delle cellule (se applico elevata P i microorganismi muoiono) quindi devo lavorare in largo eccesso con aria affinché il processo riesca ad avere l'aria di cui ha bisogno. L'aria deve essere sterile.

I costi dell'alimentazione dell'aria sono elevati (pompaggio + filtrazione).

Anche i materiali di partenza ha dei costi; più è semplice il substrato e più è economico se invece devo aggiungere al substrato alcuni componenti avrò costi in più. Anche il substrato dovrà poi essere sterilizzato.

Controllerò poi il processo affinché l'organismo venga mantenuto vivo.

Il n° delle sonde è tipicamente 3 per ogni punto di controllo (se uno si intasa almeno ce ne sono altre 2).

Le redox sono reazioni esotermiche, nel caso degli antibiotici possiamo avere anche l'incremento di 1° C all'ora.

Anche il pH è un problema a cui dobbiamo stare attenti, dobbiamo prendere come riferimento quella della cellula.

Le sonde del pH sono degli elettrodi, questa sonda è spesso collegata a serbatoi. Il pH deve essere costante e resistente all'ambiente acquoso, anche le sonde devono essere sterilizzate.

Anche la concentrazione di zuccheri è fondamentale, esiste infatti l'inibizione degli substrati.

Il downstream, dove separiamo e purifichiamo il prodotto, è fondamentale.

Il costo del downstream varia in base alle fermentazioni.

Nella sua forma più semplice, il bioprocesso può essere visto come la miscelazione di microorganismi con un brodo nutriente che consente ai microorganismi di reagire con una soluzione zuccherina per dare un prodotto.

Substrato: ciò che noi mettiamo al microorganismo per farlo crescere sano e vitale, è costituito da una serie di

nutrienti, in primis il glucosio. I lieviti quindi funghi unicellulari sono in grado di degradare una serie di substrati che altri organismi non sono in grado di fare.

Gli enzimi nascono in ambiente acquoso ma quando vengono immobilizzati da qualche parte possono essere lavorati anche in solvente. Il grosso vantaggio dell'usare l'enzima è operare con un reattore eterogeneo e quindi operare con una catalisi classica.

FLOWCHART OF AN INDUSTRIAL FERMENTATION PROCESS:

La prima parte è l'upstream. I reagenti sono microorganismo, substrato e eventualmente aria.

Il microorganismo è un reagente vivo che noi vogliamo mantenere vivo per raggiungere le rese che ci siamo imposti. Anche il reagente substrato è molto complesso, normalmente lo prepariamo attraverso un processo di miscelazione con l'obiettivo di massimizzare il prodotto; il substrato può essere utilizzato da più microorganismi, deve essere sterilizzato e bisogna evitare che altri microorganismi lo utilizzino e al tempo stesso devo evitare di degradare il substrato stesso. Ogni volta che si fa partire il processo di produzione devo sviluppare l'inoculo che sta normalmente conservato (es. al freddo).

Bisogna fare uno scaling up della quantità di microorganismo che poi andrà messo nel fermentatore finale.

La seconda parte è il downstream, purificazioni e separazioni dipendono dall'obiettivo finale.

Abbiamo a che fare con oggetti che esistono a P e T ambiente, tutto quello che può fare danno come trattamento con solvente o con T vanno pensati ad hoc.

Bisogna giustificare la tracciabilità del sistema e garantire un controllo di qualità rigoroso, non ci devono essere residui di produzione o residui di substrato.

Dentro al bioreattore ci sono tutte le sostanze nutritive che devono andare a concorrere alla crescita e allo sviluppo dell'organismo. Esistono sostanzialmente due fasi, tropofase (fase di crescita), idiofase (fase stazionaria della biomassa) e bisogna cercare di massimizzare la produzione.

Tutti i processi partono da un substrato che viene messo a contatto con il microorganismo, da questo contatto (con anche eventualmente O_2) avvengono processi intramolecolari e biochimici, si ottengono sostanzialmente tre prodotti: *biomassa* ossia l'organismo che si è prodotto, *metaboliti* e *macromolecole extracellulari*.

La differenza dei processi è data dal microorganismo e dallo spettro dei prodotti finali.

Al microorganismo quello che interessa è fare proteine per poter cioè riprodursi. Costruisco un substrato e costruisco le condizioni operative per ottenere il prodotto d'interesse.

I processi biotecnologici richiedono un grande controllo perché normalmente sono processi di larga scala e che devono portare ad una buona resa finale, partendo spesso da materie prime che potrebbero essere molto diverse tra di loro. Ciascuno di questi processi avrà un bioreattore sviluppato ad hoc in modo tale che la reazione possa avvenire nel modo migliore.

Metaboliti primari → metaboliti sintetizzati dalle cellule perché indispensabili per la loro crescita. Vi sono metaboliti come etanolo, acido acetico e acido lattico che sono molecole terminali ossia il microorganismo, in seguito ad una serie di reazioni biochimiche che hanno lo scopo di portare a crescita della biomassa, produce quelle molecole. La cellula per crescere ha bisogno di quei prodotti di degradazione del substrato quindi intanto che cresce degrada il substrato e produce ad esempio l'etanolo.

Anche gli acidi organici sono metaboliti primari, gli acidi organici (soprattutto quelli tricarbossilici) fanno parte del ciclo di Krebs ma non sono il prodotto terminale (che è CO_2 e acqua). Sono metaboliti primari indispensabili alla crescita ma non vengono accumulati naturalmente perché intermedi del ciclo e non terminali.

Esistono poi una serie di prodotti definiti metaboliti secondari → tutte quelle molecole che normalmente la cellula non usa perché non richiesti per trattamenti metabolici primari. Sono una serie di molecole che vengono prodotte e messe in atto con obiettivo di difesa (es: antibiotici, molecole in grado di uccidere altri microorganismi quando sono in condizioni di forte stress o disagio). Forte stress = mancanza cibo, poco glucosio.

VANTAGGI:

-Si possono produrre cose che normalmente, fatte per sintesi, non si potrebbero fare perché le molecole prodotte sono così complesse che non c'è vantaggio nell'andarle a produrre chimicamente parlando. Il n° delle operazioni, trattamenti e reazioni sarebbero troppo grandi e quindi non ci sarebbe convenienza economica.

- Stereo-specificità e regio-specificità, le reazioni sono stereospecifiche cioè portano ad una configurazione molecolare specifica e sono regiospecifiche quindi portano alla formazione esclusiva di un solo isomero costituzionale. Portano a prodotti che hanno già le stereo caratteristiche finali.
- Il grosso vantaggio a operare a microorganismo completo è che i passaggi li fa la cellula. La sintesi enzimatica di solito viene fatta solo all'ultimo passaggio in modo da essere sicuri di ottenere il prodotto desiderato. Se uso il microorganismo completo i passaggi li fa lei mentre se voglio usare l'enzima il problema è dato dal fatto che per ogni passaggio ho un enzima diverso.
- Ambiente acquoso, assenza di solventi e quindi non abbiamo il problema dell'abbattimento del solvente o separazioni. Le acque esauste verranno comunque trattate.
- Substrati rinnovabili, generalmente non tossici e non infiammabili, sono scarti agricoli (conviene a noi per fare la fermentazione e allo stesso tempo si stanno usando scarti).
- Condizioni più miti quindi meno costi energetici.

SVANTAGGI:

- La produzione biotecnologica può essere facilmente contaminata, ci ritroveremmo con una serie di sottoprodotti che non desideriamo.
 - Problema di separazione: molti prodotti e molto simili tra di loro.
 - Per ottenere una certa resa di reazione occorrono tempi lunghi.
 - Sterilizzazione dell'aria per assicurare l'aspetti.
 - Dover rispondere a protocolli di sicurezza e controllo qualità
 - Si può avere inibizione del substrato. Non è detto che i prodotti non siano tossici per le cellule. In natura questo problema non avviene quasi mai perché la cellula si trova in un ambiente grande e cresce con velocità inferiori a quelle industriali. Nel bioreattore però è un rischio.
 - I microorganismi si comportano come black box, ci si ritrova a operare con cellule che talvolta presentano comportamenti anomali.
 - Problemi di raffreddamento, tendenzialmente non si lavora a caldo, le reazioni spesso portano un aumento di calore quindi si cerca di lavorare a T costante.
 - Instabilità genetica, c'è possibilità di mutazione, nel caso dei processi biotecnologici è un danno molto grande perché i microorganismi sono stati selezionati per essere ottimali per il processo. Se si modificano portano dunque a prodotti non voluti.
- Basse concentrazioni del prodotto finale.
Trattamento di grandi quantità di acqua reflue.

La scalatura bisogna farla sempre: il microorganismo ha problemi di adattamento all'ambiente in cui cresce, si aumenta progressivamente la dimensione del reattore fino ad arrivare al reattore di semina che verrà utilizzato poi per arrivare al fermentatore.

Ho 3 fattori principali che limitano lo scale-up:

- 1) Apporto di ossigeno che dipende dal volume del reattore.
- 2) Effetto di shear legato alla miscelazione, dobbiamo agitare un liquido non newtoniano e in cui continuamente viene cambiata la concentrazione dei solidi. Il microorganismo e la biomassa aumentano e quindi dobbiamo aumentare l'agitazione → costi aumentano e effetti di shear, i microorganismi sono sensibili agli sforzi di taglio; nel momento in cui li stiamo agitando potrebbero cambiare via metabolica e portare a molecole diverse da quelle previste o addirittura morire. Dobbiamo allora andare a separare qualcosa che è ancora più complesso e in più la separazione progettata era sui prodotti previsti. Gli sforzi di taglio ci sono sempre, derivano dall'agitazione, quando questa non c'è derivano dalle bolle di ossigeno che mettiamo per areare il sistema.
- 3) Formazione di metaboliti tossici che possono derivare anche a causa di questo cambiamento della via metabolica.

CONSIDERAZIONI ECONOMICHE:

Materie prime + costi fissi (costi energetici, costi per pompare o agitare ecc) + utilities (l'acqua, l'aria, il fatto che aria debba essere filtrata ecc) + lavoro (persone che lavorano nell'impianto) → viene fatto un compromesso tra tutto ciò. Il governo agevola economicamente gli impianti tramite tassazioni ed è portato a favorire questi processi in condizioni di necessità (es: USA → transizione a prodotti di fermentazioni che partivano dall'utilizzo dei cereali per promuovere

un'industria basata su questa materia prima). Il governo favorisce anche la ricerca in modo che si possa passare all'uso di una materia prima che abbia meno impatto ambientale.

Costi importanti dati da costi di aerazione e agitazione, questi vengono valutati di volta in volta in base alla produzione che stiamo facendo. Se produzione aerobia l'ossigeno è un costo importante così come il mixing di raffreddamento.

Margine di intervento dato dal substrato, andare a scegliere substrati molto ossigenati.

Fare una scalatura e avere una automazione più grande.

Altro problema è il recovery del prodotto, ci troviamo in una condizione in cui abbiamo tanti prodotti molto simili tra di loro, presenti in basse concentrazioni, e essendo organici sono labili ad una serie di condizioni.

Altro problema è mantenere l'asepsi, bisogna sterilizzare tutto quello che deve entrare nel reattore: va sterilizzato il substrato, l'aria e le apparecchiature. Altri costi sono dati dal cooling, per minimizzare ad esempio si cerca di sterilizzare il substrato e contemporaneamente riempire il reattore.

MICROORGANISMO

Va selezionato il microorganismo più adatto, produttivo e resistente, dopodiché si fanno mutazioni generando ceppi mutanti che in natura difficilmente sopravviverebbero; questo perché sono stati selezionati per crescere, riprodurre e vivere con un substrato che è stato creato appositamente per loro.

Si mettono dentro al reattore le molecole necessarie affinché il microorganismo possa resistere.

In natura l'eccesso non si fa, non si consuma il substrato per produrre cose non necessarie in quel momento, cosa che invece noi vogliamo.

Il mutante prodotto deve essere abbastanza stabile, deve essere conservato nel frigo.

Prendiamo il reattore e mimiamo le condizioni di tropofase e idiofase. I prodotti normalmente vengono fatti o nella fase stazionaria o quando sono in fase di stress.

Il n° di cellule deve essere tale per cui la produttività e quindi la resa sia quella che desideriamo.

Per arrivare a quella concentrazione di organismi produttivi dobbiamo però prima farli crescere, devono dunque passare nella tropofase. Stessa cosa vale se i prodotti desiderati sono intermedi. Potremmo dunque trovarci nella condizione di due reattori, uno di crescita e uno di produzione, altrimenti bisogna pensare a due substrati differenti per le due fasi diverse.

Si distinguono due tempi: il *tempo di generazione* ossia il tempo di duplicazione necessario per una cellula di farne un'altra uguale a se stessa e il *tempo di raddoppiamento*, tempo necessario perché il peso della biomassa all'interno del bioreattore raddoppi, è quello che ci interessa. Tanto più piccola è la cellula da duplicare e tanto è più veloce il tempo.

Vantaggi dei microorganismi:

- Crescono più velocemente di piante e animali.
- Riducono la richiesta di spazio: piante occupano molto spazio.
- Non hanno problemi climatici.
- Non ci sono malattie o infezioni come nel caso di piante e animali.

CURVA DI CRESCITA DEGLI ORGANISMI

La curva di crescita di una biomassa può essere suddivisa in molte parti, ha un andamento a massimo.

Il microorganismo inizia a svilupparsi, cresce esponenzialmente poi decelera, raggiunge una fase stazionaria e infine muore. La curva è legata al substrato disponibile all'interno del bioreattore.

La pendenza massima non coincide con la massima concentrazione di substrato.

La fase di acclimatazione c'è sempre e implica che la fermentazione non è efficiente subito, questo perché gli organismi devono adattarsi al tipo di substrato che hanno davanti; è un tempo poco utile che diventa tanto più lungo quanto minore è la concentrazione degli organismi all'interno del reattore. È una fase che posso contenere andando a regolare il modulo della concentrazione rispetto al volume del reattore. È per questo che devo fare l'inoculo e la semina ogni volta che parto. La scalatura serve a minimizzare questa fase.

Alla curva di crescita è legato il problema di ciò che voglio produrre, devo capire in quale fase della curva di crescita viene prodotto il nostro organismo. Ci sono per esempio prodotti che nascono nella fase esponenziale oppure nella fase di decelerazione o nella fase stazionaria, in quest'ultimo caso avrò vie metaboliche classiche (es. per microorganismo aerobio lui farà Krebs).

Le differenze saranno le tipologie dei prodotti che i microorganismi stanno facendo oppure la concentrazione del microorganismo.

Corrispondono vie metaboliche parallele che vengono attivati solo nella fase stazionaria o di decelerazione.

Il tempo caratteristico di durata del processo è stabilito proprio dalla curva di crescita dell'organismo.

Una volta che il microorganismo raggiungerà la fase di massima concentrazione sapremo quale sarà la nostra fase d'interesse e dovremo studiare le condizioni e fare modifiche al sistema per far sì che i microorganismi transitino in queste fasi d'interesse. Devo massimizzare il tempo di crescita esponenziale, sia che il prodotto sia il microorganismo sia che il prodotto è un qualcosa che voglio accumulare. Se il microorganismo deve crescere in fretta automaticamente dovrà consumare il substrato.

Fase lag: non succede niente perché è la fase di acclimatazione, i microorganismi iniziano ad attivare gli enzimi, può essere lunga o corta, voglio minimizzare questo tempo, fortemente dipendente dal rapporto volume reattore/concentrazione degli organismi.

Faccio in modo che la biomassa possa adattarsi pian piano attraverso la scalatura.

L'alimentazione dell'aria inizia nel momento in cui mettiamo il microorganismo nel reattore e finisce quando stoppiamo il processo, abbiamo costi dell'esercizio (alimentazione, sterilizzazione, agitazione → costi energetici).

Transient deceleration: inizia a crescere, la pendenza della curva sembra abbassarsi, la velocità diminuisce ma solo per un momento. Abbiamo a che fare con un riarrangiamento della biomassa alle nuove condizioni.

Fase costosa perché ho costi di esercizio + costi di substrato, qui il microorganismo sta crescendo.

Devo fare in modo che le fasi poco produttive siano le più brevi possibili, vado a operare in modo tecnologico: sviluppo inoculo, semina, scaling up, per rendere corto un tempo improduttivo.

Fase esponenziale: il microorganismo cresce in modo logaritmico.

Se il mio obiettivo è la produzione del microorganismo non arriverò mai in alto ma mi fermerò quando raggiungo la velocità massima di crescita che dipende dal substrato e dall'affinità del microorganismo con il substrato (quanto è in grado di degradare quella sostanza). Si potrebbe andare avanti ancora un po' ma si evita di farlo per non ottenere una degradazione al 100% del substrato per preservare la biomassa.

Quando il microorganismo cresce, inizia a colonizzare il reattore; all'interno di questo abbiamo una concentrazione di solido, cioè di microorganismo, che va progressivamente a crescere rispetto alla concentrazione di liquido → la composizione di quel bioreattore non è costante.

I microorganismi che crescono progressivamente si mangiano il substrato quindi la concentrazione di zucchero diminuisce. Quindi ho diminuzione di cibo disponibile e cambiamento di domanda di ossigeno, dobbiamo alimentarne di più e garantire la distribuzione omogenea in tutto il reattore e questo, man mano che andiamo avanti, è sempre più difficile. Aumentano i costi dell'esercizio. Si preferisce non arrivare dunque a completa degradazione del substrato, la stessa cosa vale nel caso delle sovrapproduzioni.

Domande da farci nel momento della scelta del microorganismo:

- 1) Riuscirà a produrre ciò che mi interessa?
 - 2) Domande riguardanti le caratteristiche desiderate dell'organismo.
 - 3) Può un microorganismo crescere su un mezzo semplice e poco costoso?
 - 4) Il mio microorganismo ha bisogno di essere più resistente alla contaminazione?
- 3 e 4 sono fondamentali per portare alla produzione industriale una diminuzione dei costi.

CONTAMINAZIONE non è avvelenamento da sostanze tossiche, per contaminante si intendono altri organismi che casualmente (attraverso l'aria o analizzatori di ossigeno o punti di prelievo della biomassa) potrebbero entrare nella fermentazione. Pur avendo sterilizzato tutto può succedere che i microorganismi possano entrare a contatto con altri organismi.

Il microorganismo dovrebbe:

- i) Essere in grado di crescere in un mezzo semplice
- ii) Essere in grado di crescere vigoroso, rapido e produrre il prodotto desiderato
- iii) I suoi prodotti finali non dovrebbero essere tossici e avere materiali indesiderati
- iv) Genetica e fisiologia stabile, la genetica è difficile che rimanga la stessa perché andando avanti con il processo è

possibile ci siano mutazioni

v) Rendere più facile da solo la separazione, se la forma dell'organismo è una forma che lo rende facilmente recuperabile è un grandissimo vantaggio

vi) Resistente ai predatori, non deve degradare da altri organismi

vii) Non richiedere troppo aria; l'alimentazione dell'ossigeno è continua, se ne è richiesto di meno si possono abbassare i flussi e quindi anche i costi

viii) Avere un patrimonio genetico facile da capire e da studiare e facile da modificare (andando a rafforzare l'evoluzione in una certa direzione o manipolare attraverso dei tools genetici come aprire il DNA e sopportare un informazione genetica che naturalmente non possiede)

MEZZO DI FERMENTAZIONE

Fonte energetica con obiettivo produzione energetica, consente al microorganismo di crescere, svilupparsi e prodursi. Contiene una serie di molecole che vogliono ottimizzare l'aspetto di crescita.

Si va a cercare un mezzo che sia a basso costo, molto spesso si fa riferimento a rifiuti di altre produzioni, devono contenere zuccheri (se semplici come il glucosio è meglio perché così dovremo fare meno modificazioni) ma ci si può accontentare anche di cose che contengono zuccheri complessi presi per esempio da scarti della produzione di formaggio che contengono proteine, zuccheri non monomeri o da corn steep liquor cioè residuo liquido che deriva dall'ammollamento dei chicchi di mais, il mais è prodotto principalmente con obiettivo amido e olio → prendo chicchi e metto dentro acqua calda acida così cavo il germe e recupero i liquidi, l'acqua acida contiene una serie di proteine, molecole che sono i costituenti del chicco di mais; composizione buona e buona formulazione.

Scarti di melasso è una fonte di glucosio, già pronto e degradato, che contiene anche una serie di vitamine e molecole già pronte per i microorganismi.

Scarti che dunque vengono riutilizzati come mezzo di fermentazione e quindi non devono essere trattati.

Il mezzo di fermentazione è uno dei margini su cui possiamo intervenire per ridurre i costi.

I costi del mezzo di fermentazione dipendono da come sarà la fonte zuccherina, tanto più sarà presente la quantità di molecole utili per i microorganismi e tanto più sarà costosa.

In base a ciò che produco scelgo la fonte zuccherina più adatta.

La scelta del substrato dipende dall'organismo mentre la sua composizione dipende dal prodotto desiderato.

Bisogna considerare la **costanza** della composizione, nel caso degli scarti altrui avremo una *variabilità delle impurezze* (se scarti di origine agricola come patate avranno ad esempio la buccia), un altro problema è il *contenuto elevato di acqua*, il grosso della fermentazione è costituito dall'acqua ma non tutte le acque sono giuste per essere utilizzate sin da subito nel reattore, il fatto è che stiamo comprando acqua e substrato, tanto maggiore sarà il contenuto d'acqua nel materiale di partenza e tanto maggiore sarà il costo in quanto compreremo al kg → substrati ad alto contenuto d'acqua costano di più.

Inoltre non è detto che l'acqua contenuta sia sempre nella stessa quantità del materiale di partenza.

Se in partenza abbiamo una costanza questo aiuta in quanto possiamo stabilire una ricetta con meno analisi.

Se lo scarto è di origine agricola inoltre è *stagionale*, es. barbabietole da zucchero solo in estate, potrebbe dunque essere molto *variabile* e quindi dopo un po' non averne più.

Dobbiamo dunque produrre sempre il substrato, anche se è il più semplice: bisogna acquistare fonti di C diversi, miscelare, in modo tale da non essere soggetti alle variabilità.

Il mezzo di fermentazione deve contenere alcuni elementi chimici: carbonio, idrogeno, ossigeno, azoto, fosforo e un po' di microelementi come zinco, ferro, cobalto e un po' di metalli siccome stanno nei mitocondri.

Le percentuali del mezzo degli elementi presenti dipendono dal microorganismo, devo dargli ciò che gli serve per costruire se stesso e questo lo capisco dalla composizione chimica di cui è fatto (tramite analisi idrogeno azoto che è un'analisi per combustione). Per quanto riguarda il contenuto del carbonio questo è uguale per tutti i microorganismi, circa il 50%. Il C sarà poi presente nei carboidrati, lipidi, acidi nucleici ecc...

Partendo da questa composizione chimica siamo in grado di ricostruirlo. Nel mezzo di fermentazione non solo dobbiamo avere la quantità esatta dei vari elementi ma abbiamo bisogno anche di far crescere l'organismo quindi dovremo mettere una serie di aggiunte, se sto facendo un processo fermentativo dovrò mettere tutte quelle cose che lo porteranno nella fase di crescita o di premorte.

Il microorganismo può crescere su terreni diversi, ad esempio uno dei modi è spezzettare terreni solidi, inocularli e

farli crescere lì (dovremo ammorliarli, aggiungere O_2 ecc), avremo però bisogno di molto spazio (problema di superficie); i mezzi di coltura liquidi sono preferibili perché richiedono meno spazio. La fermentazione sommersa a substrato liquido consente i vantaggi maggiori.

La fonte primaria è il **CARBONIO**: lo prendo dal glucosio, i carboidrati (amidi o cellulosi) sono molto buoni ma devono essere spezzettati (tramite enzimi) a glucosio perché altrimenti non possono essere usati.

All'interno del fermentatore quello che si mette è acqua.

Svantaggi idrocarburi: manca l'ossigeno e non sono solubili in acqua.

Pro: se ho scarti di idrocarburi (scarti di raffineria) e ho mezzi per degradarli posso usarli nel fermentatore.

L'ossigeno è molto poco solubile in acqua, i microorganismi che respirano che fanno Krebs hanno bisogno dell'ossigeno gassoso. L'alimentazione dell'ossigeno è un costo d'esercizio (uno dei più grandi), siccome è poco solubile in acqua alimento in continuo l'ossigeno, in più quando lo sto fornendo (reazione di fermentazione è una redox in cui ossigeno uno dei reagenti, ossiderà il glucosio a $CO_2 + H_2O$), nel caso degli idrocarburi avrò bisogno di più moli di ossigeno rispetto all'utilizzo dei carboidrati. Maggiore sviluppo di calore nel caso con idrocarburi → costi aumentano (idrocarburi meno ossidati). Gli idrocarburi devo in qualche modo nebulizzarli e renderli parzialmente disciolti, li utilizzeremo solo se sono scarti oppure per scopi ambientali.

Nelle condizioni aerobiche specifiche 1 g di glucosio produce 0.5g di cellule secche, è un rapporto che va mantenuto

AZOTO: bisogna rispettare i rapporti, per esempio nei batteri ho 12.5% di azoto dunque per produrre 5 g di batteri ci vogliono 625 mg di N. Possiamo metterlo in forme diverse, in base al tipo di fermentazione.

Possiamo aggiungere sali come solfato d'ammonio e così mettiamo sia zolfo che azoto. I sali sono solubili, siamo in ambiente acquoso quindi siamo in una condizione buona. Possiamo mettere anche ammoniaca gassosa che a contatto con acqua diventa ammonio. L'azoto si trova nelle proteine, enzimi e negli acidi nucleici.

MINERALI: sono presenti negli enzimi e in alcune parti della cellula, i principali minerali sono: P, S, Mg e Fe.

Sono richiesti anche elementi in tracce: Mn, B, Zn, Cu e Mo, sono metalli pesanti quindi tossici e perciò non devono essere presenti in grandi quantità.

Il metallo aiuta a modulare l'attività enzimatica, è un modo per attivare o disattivare gli enzimi.

Sono metalli piccoli e quindi sono facilmente attaccabili alla mega proteina.

Ogni specie ha enzimi diversi, se non ci sono l'enzima non funziona e dunque l'organismo cresce male.

FATTORI DI CRESCITA: dobbiamo introdurli noi perché stiamo componendo il substrato, vogliamo far convincere il microorganismo che quello sia il substrato ottimale per la sua crescita. Dopodiché faremo substrati per la produzione. Abbiamo vitamine, aminoacidi e nucleotidi. Siamo in presenza di molecole che non sono strettamente necessarie per fare il microorganismo ma che sono necessari per la sua crescita.

I fattori di crescita sono per esempio vitamina B, B_2 , B_6 , B_{12} , nicotinammide, acido pantotenico e sono contenuti in scarti di riso, scarti di lieviti, cereali, scarti dal trattamento di carne in particolare di fegato o liquido ottenuto dopo la penicillina.

FERMENTATORE o **BIOREATTORE**, posto in cui le cellule possono espletare le loro funzioni, va progettato ad hoc per la tipologia di processo, prodotto e del microorganismo che sto considerando. Dobbiamo mantenere omogeneità di cibo per una biomassa che è in crescita. Le condizioni operative devono essere mantenute in modo stringente.

Siamo in presenza di cose abbastanza semplici ma la progettazione include anche tutto ciò che serve per far reagire i microorganismi. Uno dei problemi è uno dei costi importanti nel caso delle produzioni biotecnologiche è il mantenimento della asepsi. L'asepsi è la condizione per cui siamo in totale assenza di altri microorganismi, diversi da quelli che devono essere coltivati, e che deve essere mantenuta in tutto il processo.

Deve essere mantenuta prima che la reazione avvenga e anche in tutte le linee e valvole dell'impianto.

È possibile che rimanga un residuo di una fermentazione precedente e quindi c'è il rischio della presenza di altri microorganismi che porteranno alla chiusura della fermentazione invece a cui siamo interessati.

Il bioreattore avrà bisogno di reazione, agitazione, di una serie di controllori (T, pH, concentrazione nutrienti).

Considerazioni riprodotte sui vari livelli di scalatura. Il bioreattore è il contenitore in cui il microorganismo viene alloggiato affinché faccia la reazione desiderata in assenza di totale contaminazione.

La dimensione dei fermentatori può essere molto diversa, può andare da scale piccole a scale industriali molto importanti. La scala più grande è più facile da esercire perché può essere gestita automaticamente.

Tre grandi categorie che dipendono dalle condizioni operative:

- 1) Non areati e non agitati (es. botti)
- 2) Areato e agitato (es. produzione antibiotico o produzione acido citrico)
- 3) Areato ma non agitato, vogliamo far crescere l'organismo in condizioni più blande, riesco a limitare e a minimizzare gli effetti di scia → effetti di agitazione possono portare a modificazioni della produzione o a mutazioni del microorganismo stesso. Rimescolamento del substrato e dell'ossigeno è lasciata ad una blanda ricircolazione del brodo di fermentazione. Effetti di scia molto pesanti tanto più complessi sono gli organismi che stiamo coltivando. Non abbattiamo tolto completamente gli effetti di scia ma riusciamo a minimizzarli.

Configurazione del processo equivale ad un problema trifasico.

Il processo biotecnologico declina una serie di cose: fase acquosa, parte preponderante che include i reagenti (C, N, fattori di crescita ecc) e una serie di molecole che sono i prodotti (enzimi extra cellulari che la cellula secerne per degradare il substrato, prodotti di scarto cellulari, prodotti escreti come etanolo, acido citrico e poi una serie di ormoni), e non acquosa che può essere liquida, per esempio una serie di oli, oppure può essere gassosa o addirittura solida.

Uno dei grossi problemi che si incontra nelle produzioni biotecnologiche è lo spumeggiamento, la schiuma tappa per esempio i fori d'uscita dei gas. Esistono sistemi di abbattimento delle schiume come sistemi meccanici o l'aggiunta di oli, alcuni antischiuma vengono mangiati dal microorganismo.

Tre modi per far crescere il microorganismo nel bioreattore: *batch*, apro, metto il substrato e chiudo, *fed-batch*, alimento il substrato poco a poco per cercare di seguire la curva di crescita oppure *continuo*, immetto il substrato e lo estraggo in modo continuo.

Ci sono dei metodi di alimentazione del substrato per prolungare la vita di una coltura batch e quindi di aumentare la resa: (1) mediante l'aggiunta graduale di componenti concentrati del nutriente, ad es. carboidrati, aumentando così il V della coltura (*fed-batch*), (2) mediante aggiunta di terreno alla coltura e prelievo di un V uguale di terreno privo di cellule utilizzato (perfusione).

Avere un processo continuo nel caso fermentativo significa alimentare substrato in modo continuo ed estrarre in continuo dal reattore il brodo di fermentazione.

Il microorganismo lo inserisco solo una volta, la semina in un reattore continuo è uguale a quella del reattore batch.

Lo metto solo una volta perché non voglio alimentare l'inoculo fresco perché dovrei aspettare la fase lag.

Un reattore continuo viene selezionato pochissimo nei processi biotecnologici, si preferisce *fed-batch* per modulare il comportamento della crescita dell'organismo. Nei reattori continui misuriamo un tempo di resistenza medio, la vera distribuzione di tempi di residenza ha un andamento a campana. Un problema del reattore continuo inoltre è dato dal garantire l'asepsi dato che è più difficile riuscire a mantenerla. Ennesimo problema: concentrazione di wash-out, dopo un po' all'interno del bioreattore non ho più microorganismo perché non gli abbiamo dato tempo di riprodursi perché l'abbiamo sempre estratto.

Nelle fasi precedenti il microorganismo non riesce a seguire il flusso e quindi la concentrazione del microorganismo diminuisce. Si gioca sul bilanciamento dei flussi nel caso dei reattori continui.

La scelta del bioreattore è data anche dalle dimensioni del prodotto che voglio ottenere, per produzioni più piccoli si usano molto i processi continui (laboratorio: analisi cinetica o controllo).

Vantaggio processo continuo: si riesce a mantenere costanti le cond operative, siamo in un caso stazionario ottimale, ci risolve i problemi di cambiamento che avvengono nei processi di tipo batch.

PARAMETRI OPERATIVI: misurati e controllati. Il successo per ottenere una fermentazione di successo dipende da quanto sono bravo a mantenere le cond operative. L'accumulo va evitato.

I parametri operativi che devono essere considerati sono: T, P, formulazione del mezzo, controllo della schiuma, agitazione, pH, O₂ e CO₂ disciolto e analisi dei gas. Le azioni che posso fare è mettere dei sensori che siano in grado di seguire i parametri. Devo poter registrare ciò che accade nell'impianto perché in questo modo posso risalire alla fonte di eventuali problemi. Devo controllare anche le reazioni redox, livello enzimatico oppure la composizione della biomassa, n° delle cellule e dimensioni delle cellule. Molto spesso le sonde sono presenti e devono essere in grado di

misurare in modo corretto, dare una distribuzione all'interno del reattore e essere resistenti perché spesso si trovano in ambiente acquoso con pH bassi. Devono essere poi lavati per bene se magari prima erano stati utilizzati in un altro processo di fermentazione. Gli ingressi delle sonde devono riuscire a resistere a queste temperature. I costi per generare e mantenere livelli di asepsi molto alti sono importanti.

BIOECONOMY

È l'applicazione della biotecnologia alla produzione primaria, alla salute e all'industria al fine di contribuire ad un miglioramento economico.

Esiste una metodologia di valutazione del grado di maturità di una tecnologia chiamata TRL, misura lo sviluppo dell'idea da 0 a 7: 0 → ho solo l'idea, 3-4 → ho fatto alcuni esperimenti e ho ottenuto dei risultati, potrebbero essere applicati a livello industriali 7 → impianto illustrativo.

Bisogna interfacciarsi con biomasse rinnovabili e ottenere un processo sostenibile dal punto di vista rinnovabile e industriale, si vuole produrre materiali sostituivi per poter poi essere degradati in modo efficiente.

Arrivare ad una bioeconomy non significa sostituire subito tutto ciò che è chimico ma si intende una sostituzione parziale. Fare bioeconomy significa trovare altri obiettivi per determinati materiali primi.

La bioeconomy impatta sulla salute in termini di prodotti farmaceutici, biotecnologie medicali e tecnologie medicali.

Impatta anche sulla produzione delle chemicals, energia, materiali e food & drink.

C'è anche l'impatto sulla produzione di tipo primario quindi sull'agricoltura e sulla produzione marina.

Esempio: produzione delle olefine in un modo differente.

Biorefinery: produzione autosostenuta a partire dagli scarti delle biomasse alimentari.

Prodotti tipici di una bioraffineria: chemicals (prodotti a partire da processi fermentativi), biomateriali, bioenergia, controllo dell'ambiente, bioremediation delle acque domestiche e industriali con possibile riutilizzo, trattamento di acque più inquinate.

L'obiettivo è quello di diventare competitivi rispetto all'economia del petrolio (produrre tutto ciò che produrrebbe il petrolio ma con vie biotecnologiche). Grosso sforzo: usare biomasse di SCARTO.

CLASSIFICAZIONE DELLE COSE VIVENTI

1) Tipo di cellula: procariote o eucariote. I procarioti sono cellule che hanno il nucleo non separato dal resto della cellula, cosa che invece avviene negli eucarioti, quest'ultimi hanno molti organelli separati dal resto della cellula.

2) Livello di organizzazione: singola o multi cellula, un organismo unicellulare cresce rapidamente ed è più facile da gestire rispetto ad un organismo multi cellulare.

3) Tipo nutrizionale: eterotrofia e autotrofia. Organismi eterotrofi ricavano energia e le molecole da fonti esterne, gli autotrofi (piante) sono in grado di generare le molecole organiche di cui necessitano a partire da sostanze inorganiche semplici come CO_2 e H_2O , sono quindi capaci di nutrirsi da soli.

Organismi viventi:

Procarioti → batteri, cianobatteri, possono essere autotrofi o eterotrofi

Eucarioti → protisti, funghi, muffe, piante e animali

Parete cellulare presente nelle piante, può avere composizioni differenti. Se il microorganismo ha la parete cellulare fatta in un modo piuttosto che nell'altro fa sì che riusciremo a suddividere i batteri in grandi positivi o no.

Archia → organismi che vivono in condizioni particolari come grandi concentrazioni di ioni o zolfo o a pressione del fondale marino, sono in grado di sopravvivere e riprodursi in condizioni estreme.

Le cellule sono la base unitaria della vita. Le cellule sono tipicamente piccole perché hanno messo in atto una particolare strategia di sopravvivenza: le cellule devono interagire con l'ambiente, assorbire nutrienti, assorbire e scambiare gas, espellere i prodotti di scarto. Perché i nutrienti possano essere assorbiti e i gas scambiati in modo adeguato la cellula ha bisogno di una grande superficie. *Tanto più grande è la dimensione della cellula e tanto più lenta sarà la diffusione* (gas da esterno all'interno, prodotti di scarto da interno all'esterno) e quindi lo scambio di gas.

Rapporto superficie volume → più il diametro è piccolo e migliore è questo rapporto.

Le cellule sono dei sistemi complessi caratterizzati da una grandissima capacità di adattarsi in funzione delle condizioni esterne e quindi in funzione della disponibilità della materia e energia, hanno adattabilità a condizioni più critiche.

Metabolismo: catabolismo in grado di degradare prodotti assorbiti dall'ambiente generando così energia in modo tale da poi effettuare l'anabolismo (sintesi di sostanze complesse).

Possono avere dimensioni e complessità diverse, possono riprodursi in modo diverso o per mitosi o asessualmente, hanno tutti un patrimonio genetico e quindi sono in grado di trasmettere alla progenie le caratteristiche cellulari.

Caratteristiche comuni in tutte le cellule:

- 1) Membrana citoplasmatica che separa il citoplasma all'interno delle cellule dall'esterno.
- 2) Citoplasma, miscela acquosa di macromolecole utilizzate dalla cellula per fare energia.
- 3) Ribosomi, fanno avvenire sintesi delle proteine.
- 4) DNA, controlla funzioni cellulari,

I virus non sono cellule, non hanno queste quattro caratteristiche → virus considerati a parte, microrganismi non cellulari.

I procarioti sono molto più piccoli degli eucarioti. Gli eucarioti sono circondati da una membrana cellulare fatta di lipidi (informazione utile per pulire reattori → degradiamo lipidi con un detergente ad hoc).

I procarioti sono organismi unicellulari privi di nucleo cellulare e di organelli legati alla membrana; gli eucarioti ospitano il DNA in un nucleo chiuso dalla membrana e hanno organelli. I procarioti sono le cellule più semplici.

L'organizzazione delle cellule segue una struttura gerarchica: le subunità monomeriche nelle proteine, negli acidi nucleici e nei polisaccaridi sono unite da legami covalenti.

Le macromolecole sono però legate tra di loro da legami non covalenti, spesso da legami idrogeno o da interazioni Van der Waals. Per rompere le singole unità dunque faccio più fatica rispetto al rompere le macromolecole.

I cloroplasti sono organuli presenti nelle cellule delle piante e nelle alghe eucariotiche, all'interno di questi si svolge il processo della fotosintesi clorofilliana. I flagelli servono a muoversi e possono avere forme diverse.

Le fimbrie hanno obiettivo interazioni con l'esterno, sono utilizzate nella formazione dei biofilm (aggregazione complessa di microrganismi).

I procarioti pur essendo più piccoli degli eucarioti funzionano bene, sono in grado di colonizzare ambienti in tempi minori a causa della velocità elevata e quindi riescono ad adattarsi meglio.

Originariamente pare che per primi si siano generati i procarioti ancestrali, da loro sono derivate cose diverse, una via è andata verso i batteri, un'altra per i cianobatteri e ad un certo punto sono comparsi i mitocondri, organelli degli eucarioti in cui avviene la respirazione. I mitocondri hanno un loro patrimonio genetico, è dunque un organismo all'interno di un altro organismo. Una teoria evolutiva quindi afferma che siamo partiti da procarioti, questi hanno generato una serie di cose + i mitocondri.

MICRORGANISMO

Possono essere *buoni*, utilizzati a scopo produttivo, sono in grado di conservare alimenti, di produrre molecole, vanno ad impattare prodotti come alimenti, bevande e farmaci. Possono essere *brutti* perché i microrganismi sono in grado di degradare sostanze che per loro sono substrati ma che per noi sono ad esempio cibo o bevande (irrancidimento del latte). Infine possono essere anche *cattivi*, possono causare malattie e infezioni, si possono avere effetti di intossicazione (tossine che i batteri generano durante il loro colonizzare) oppure problemi legati alla produzione metabolica di certi batteri che danno luogo a effetti collaterali se per esempio ingeriti oppure messi a contatto con il nostro corpo (cosmetici).

Tre pacchetti: batteri, archea (procarioti), eucarioti (funghi).

Gli archea sono molto ai batteri ma si differenziano perché i primi sono quelli che si possono trovare in condizioni estremi.

Archei e batteri vengono utilizzati nei bioprocessi, sono procarioti quindi hanno una cellula semplice in cui il loro patrimonio genetico è conservato in un cromosoma circolare non racchiuso da una membrana.

Hanno una parete cellulare costituita da peptidoglicano che è rigida e ha una funzione protettiva

In funzione di come è fatta la parete gli organismi saranno più o meno sensibili agli antibiotici, gli antibiotici sono un modo per andare a controllare la crescita di batteri non voluti.

NOMENCLATURA E CLASSIFICAZIONE: Il nome scientifico è scritto o in *italico* o sottolineato, si usa molto il latino.

ARCHEA

Sono procarioti, simili ai batteri ma con caratteristiche diverse. Non hanno mureina nella parete cellulare.

Sono molto adattabili, si possono trovare in ambienti estremamente difficili da colonizzare. La fisiologia e la natura degli archea fa sì che siano classificati in: *metanogeni*, procarioti in grado di produrre metano, *alofile estremi*, procarioti in grado di vivere in concentrazione elevate di sale (le conc saline vengono utilizzate spesso per distruggere i batteri a fine processo), *termofili estremi*, procarioti che vivono ad alte temperature (si trovano in prossimità dei vulcani). La loro possibilità di sopravvivenza deriva da come è strutturata la loro parete.

BATTERI

I batteri si riproducono in fretta, hanno un patrimonio genetico facilmente studiabile e sono procarioti.

Noi utilizzeremo dal punto di vista industriale la serie dei proto-batteri, gli actinobatteri, i cianobatteri e i batteri sulfurei. I batteri si riproducono per fissione binaria. La produzione di energia può essere affrontata in modo diversi: fotosintesi, utilizzando molecole organiche e usando molecole inorganiche.

I batteri vengono identificati in funzione:

- Forma → cocci (sfere), bacilli (bastoncelli), spirali (elicoidali) o anche forme inusuali come stella e rettangolari.
- Arrangiamento → single, appaiate, catene, clusters (ammasso); soprattutto i bacilli si possono arrangiare.
- Dimensione → alla fine di un processo devo fare separazione, il fatto che i batteri siano piccoli significa anche che il peso della massa è bassa, ho un problema e dunque devo scegliere se fare un processo a membrana, centrifugazione o filtrazione, dipende dalle dimensioni dell'organismo.
- Gram positivi vs gram negativi → se batterio può essere controllato tramite uso di antibiotici.
- Aerobici vs anaerobici.
- Habitat → devo conoscere T, P, pH e conc salina del substrato, sceglierò il microorganismo con l'habitat con condizioni più normali in quanto più facili da gestire. Conoscere l'habitat ci consente di scegliere l'organismo migliore. Abbiamo i psicrofili con $T < 20^{\circ}\text{C}$, mesofili con T a $40-50^{\circ}\text{C}$ e termofili con $T > 50^{\circ}\text{C}$. Acidofili $\text{pH} < 5$ e alcalofili per $\text{pH} > 9-10$. I batteri sono tendenzialmente anaerobi

TEST DI GRAM

Gram per identificare le tipologie di batteri li colorò con il cristal violetto, un indicatore, dopodiché feci un trattamento con ioduro in modo da fissare il cristal e dopo l'applicazione dell'acetone notò che il colore rimase in alcuni batteri e in altri invece no. Quindi scopri che c'è una correlazione tra alcuni batteri e la soluzione di cristal violetto, la parete cellulare una volta entrata in contatto con l'indicatore non tornava indietro.

I batteri gram positivi hanno una parete cellulare molto compatta e che non consente, una volta che ho fatto i legami, al solvente (l'acetone) di rimuovere le molecole che danno quel colore.

I batteri gram positivi hanno un acido teicoico attaccato al peptidoglicano, costituente della parete cellulare.

L'acido teicoico fa in modo che la superficie dell'organismo sia molto più compatta e quindi più difficile da sradicare.

Il test di gram serve a capire quali batteri sono sensibili alla penicillina, infatti la penicillina andava a influenzare direttamente la parete, fingeva di essere un amminoacido e quindi il microorganismo utilizzava in modo indifferenziato l'amminoacido corretto o la penicillina, se usavano quest'ultima la parete avrebbe presentato poi dei buchi e dunque il microorganismo moriva.

I gram positivi sono sensibili alla penicillina mentre per i gram negativi dipende, alcuni lo sono altri no.

Il gram positivo poi può essere digerito dal lisozima, quest'ultimo è uno dei modi per aprire i microrganismi, si aggiungono a fine produzione in modo che la parete venga degradata, viene usato anche per fare asepsi. I gram negativi invece non possono essere digeriti. I gram + hanno pochi lipidi rispetto ai gram -.

I proteobatteri sono tutti gram -, includono una serie di batteri che possono avere fenomeni patogeni. Ci sono un sacco di metabolismi diversi. Gli organismi utilizzati principalmente nell'industria sono tre: acetobacter, gluconobacter, entrambi utilizzati per la produzione di acido acetico e zymomonas, quelli che sono maggiormente proposti come produttori di etanolo prendendo il posto del lievito.

I zymomonas riescono a produrre molto alcool e sono resistenti all'alcool che producono.

La produzione dell'etanolo ha il problema dell'inibizione al prodotto; troppo prodotto può portare alla morte della biomassa che lo sta producendo (come nel caso dei lieviti).

Il gluconobacter si ferma all'acido acetico e non continua ad ossidarlo fino a produrre CO_2 .

Può anche essere utilizzato per ossidare il glucosio a acido gluconico, viene utilizzato come conservante negli alimenti oppure nei mangimi perché stimolano i processi di crescita negli animali.

I cianobatteri sono batteri fotosintetici in grado di fissare l'azoto, sono coltivati in biomassa.

I firmicutes sono in grado di tollerare grandi quantità di acqua e sale/zucchero, ottimi per fare i processi in salamoia.

Sono batteri Gram +, in realtà ad alcuni firmicutes mancano le pareti cellulari per cui non rispondono alla colorazione di Gram ma dato che non hanno anche la seconda membrana, che si trova nei Gram -, li classifichiamo come Gram +.

All'interno di questa categoria abbiamo i lattobacilli, utilizzati nell'industria casearia.

Spore: le spore consentono all'organismo di resistere, sono una forma di difesa, per questo sono molto difficili da eliminare. Fare l'asepsi sulle spore è molto difficile, bisogna operare con sistemi di disinfezione.

Alcune specie sono in grado di uccidere le larve degli insetti, sono dunque coltivati e pensati come pesticidi degli animali per preservare le coltivazioni da insetti infestanti con un sistema insetticida naturale.

Non sono sensibili alla presenza dell'ossigeno, possono essere coltivati con la loro spora senza avere effetti collaterali.

La fermentazione lattica viene usata per produrre un siero, l'acido lattico, che però non è l'obiettivo finale della produzione casearia ma è in mezzo; l'acido porta alla coagulazione delle proteine, si aggregano agli ioni calcio e danno il caglio, base di partenza per la produzione dei formaggi. In questo modo si preservano le proteine del latte.

L'acido lattico se non salato è tossico per l'essere umano.

I batteri lattici si dividono in omofermentanti che producono solo l'acido lattico e eterofermentanti, arrivano al processo di crescita e sviluppo attraverso una fermentazione che non produce solo acido lattico ma che per esempio produce CO₂ o etanolo.

I batteri lattici in funzione della loro natura danno luogo alla fine della fermentazione a enantiomeri diversi.

Gli enzimi sono in grado di riconoscere solo uno dei due isomeri. Dal punto di vista applicativo spesso è richiesto solo uno dei due isomeri. Con un processo fermentativo posso andare a selezionare l'isomero, grandissimo vantaggio delle funzioni biotecnologiche: **scegliendo il microrganismo giusto posso non selezionare i prodotti ma addirittura selezionare la configurazione della molecola d'interesse.**

I batteri lattici sono usati industrialmente perché hanno una serie di caratteristiche ottime come: la loro capacità di fermentare rapidamente da materie prime economiche, richiedono poche quantità di azoto, producono alte rese dell'acido lattico stereoisomero specifico preferito, capacità di crescere a condizioni di bassi pH e alte T e la capacità di produrre piccole quantità di massa cellulare così come quantità trascurabili di altri sottoprodotti.

Tra gli actinobatteri troviamo i corinebatteri e i propionibatteri, entrambi usati nella produzione di amminoacidi.

I secondi sono anche in grado di produrre acido propionico, questo viene usato nella produzione casearia, porta al sapore di gruviera.

Le ife e i filamenti sono fondamentali per la sopravvivenza dei batteri (o hanno scopo di assorbimento o di riproduzione), questi filamenti però durante la fase di produzione e in particolare durante la fase di agitazione recano problemi in quanto la turbina tende a strappare i filamenti → bisogna operare con l'agitazione, posto che l'obiettivo sia la crescita del microrganismo, in modo tale da evitare la perdita dei filamenti.

La presenza delle ife rende più difficile la distribuzione dei nutrienti.

La separazione del microrganismo rispetto al substrato e al liquido di coltura è facilitata dalle ife, abbiamo organismi agglomerati che danno massa. Le ife vengono a svilupparsi durante la crescita, alla fine saranno presenti in quantità maggiore e dunque man mano che procedo con il processo aumenta la viscosità del sistema e va sempre di più verso un andamento non newtoniano perciò dovrò aumentare l'agitazione, dal punto di vista energetico costa di più.

FUNGHI E LIEVITO

Organismi che in modo semplice possono essere cresciuti e utilizzati per fare altri prodotti.

I lieviti vengono classificati a parte perché unicellulari ma sono comunque funghi. I funghi invece sono sistemi multicellulari. Sono eucarioti, hanno cellule più grandi, nucleo in un filamento circolare e separato da una membrana nucleare, sono cellule complesse perché caratterizzate da una serie di organelli. La loro membrana cellulare è fatta di lipidi. Sono molto adattabili e il più delle volte sono dei degradatori, hanno lo scopo di degradare in natura le sostanze organiche e sono adattabili a tipi di substrati diversi tra di loro.

La loro parete cellulare contiene chitina e crescono portando alla formazione di filamenti.

I funghi sono o aerobi, hanno bisogno dell'ossigeno, o spesso aerobi facoltativi (tipico dei lieviti).

Il metabolismo di tipo aerobio comporta una grande produzione di ATP che è il vettore energetico quindi per mantenere vive, sane e vitali cellule così complesse c'è necessità di operare aerobio, soltanto chi è aerobio è in grado di disporre di un apporto energetico per mantenere le cellule vitali.

I lieviti sono funghi unicellulari eucarioti e preferenzialmente operano aerobio ma non obbligatoriamente, se scelgono la via dell'anaerobio avremo prodotti diversi ma anche velocità di crescita diverse.

I lieviti vengono usati per la produzione dell'etanolo, bevande alcoliche, pane, alcaloidi (sostanze farmaceutiche) ecc... Generalmente i lieviti non hanno effetti patogeni.

I lieviti si riproducono tipicamente in maniera asessuata ma hanno anche modo di riprodursi in modo sessuato, la scelta di una via rispetto all'altra dipende molto dalle condizioni operative esterne.

I funghi sono chemioeterotrofi, hanno bisogno di assorbire carbonio dall'ambiente perché non svolgono la fotosintesi ma producono energia tramite l'ossidazione di vari tipi di sostanze. Si riproducono per gemmazione, quando la cellula figlia ha raggiunto dei livelli di dimensione sufficienti si separa e diventa una cellula a se stante.

Le muffe e i funghi sono multicellulari costituiti da masse di micelio, che sono composte dalle ife.

Sono più facili da separare, costi minori di centrifugazione.

Nei *funghi imperfetti*, ossia funghi noti solo nella forma asessuata, troviamo l'*Aspergillus*, produce aflatossine (problema importante nel caso della conservazione) ed è utilizzato come produttori di acido citrico e il *Penicillium*. L'*aspergillus* è in grado di dare ife e questo possono essere vegetative (servono alla riproduzione) o di assorbimento, esse sono fondamentali per la crescita dell'organismo e quindi se vengono strappate a seguito dell'agitazione è un problema. Ci sono due tipi di *Aspergillus*, c'è quello *niger* che produce acido nitrico e anche gluconico a partire da zuccheri, e c'è quello *oryzae* utilizzato per la fermentazione del riso o della soia (portano alla produzione di salsa di soia, riso fermentato ecc).

Il *Penicillium*, che è l'altra entità utilizzata nella produzione di antibiotici, viene utilizzato perché attualmente le penicilline, prime molecole con capacità antibiotica non hanno più attività biologica cioè non sono più in grado di combattere le malattie ma sono dei meravigliosi sintoni, molecole che possono essere utilizzate come mattoni di partenza per la produzione di nuovi farmaci.

Il *Penicillium* si divide in *notatum* che veniva utilizzato inizialmente, esso però produce troppe ife e quindi è più difficile da gestire nei reattori e quindi venne sostituito dal *chrysogenum* che può essere coltivato nei reattori sommersi, ho il *camemberti* che fa la crosta tipica del Camembert.

Lieviti funghi unicellulari, si dividono per fissione in modo simmetrico.

Sono molto utilizzati in biotecnologia perché facili da crescere, non sono particolarmente patogeni, crescono abbastanza bene anche su substrati di scarto, sono in grado di arrivare a range di pH anche abbastanza alti.

CICLO PRODUTTIVO

Importantissimo conoscerlo in modo da poterlo poi governare per fare in modo che sia il più efficiente possibile.

Capire anche le condizioni operative che ottimizzano il ciclo.

Lieviti hanno produzione o asessuata o sessuata; il fatto che venga scelta una o l'altra via dipendono dalle condizioni (T, P, substrato, concentrazioni ecc) esterne → noi applichiamo cond per far sì che scelgano la via asessuata così in questo modo eviteremo mutazioni (conservare il patrimonio genetico è fondamentale e soprattutto l'organismo che ho è già stato modificato per massimizzare il processo).

Il fatto che si modifichi un po' il patrimonio genetico significa che cambierà un po' la distribuzione dei prodotti, se si tratta ad esempio solo di una mancanza leggera di proteina non è un problema così grande, se invece quello che sto producendo è qualcosa che voglio mangiare devo riformulare e andare a bilanciare le cose.

ALGHE

Sono eucarioti, hanno una parete cellulare costituita da cellulosa, sono organismi fotosintetici quindi sono in grado di produrre ossigeno e sostanze organiche, esistono tipologie diverse caratterizzate da colori diversi (verdi, rosse, marroni) la cui natura dipende dalla loro profondità marina (dalle radiazioni che li raggiunge).

Anche nel caso delle alghe c'è possibilità di riproduzione sessuata e asessuata, le alghe vengono utilizzate con obiettivo estrazione.

Le alghe brune che hanno nella loro parete cellulare e acido alginico vengono coltivate con obiettivo di recupero di algina, che è un polimero, oppure recupero della clorofilla e xantofilla.

Le alghe rosse hanno la parete costituita da cellulosa, all'interno della cellula è presente il carragenina e l'agar, due polimeri utilizzati in produzione farmaceutiche e cosmesi. L'agar è un gel bianco che può essere usato come base di crescita e di sviluppo, la carragenina è molto utilizzata per produzione alimentari (modulatore di viscosità → marmellate, zuppe ecc).

Le alghe verdi con cui recuperiamo clorofilla e una serie di polimeri di zuccheri.

BACILLARIOPHYTA: vengono utilizzati per produzioni biotec. Contengono clorofilla, carotene, xantofilla. Sono le diatomee le quali sono in grado di stoccare e hanno capacità assorbenti.

CARBOIDRATI

Sono zuccheri complessi che una volta mangiati verranno scomposti in zuccheri semplici.

Zuccheri semplici costituiti da atomi di carbonio e da un certo numero di gruppi OH, attraverso legami covalenti

- Monosaccaridi
- Disaccaridi
- Oligosaccaridi
- Polisaccaridi

Il glucosio è uno zucchero sempre coinvolto.

Monosaccaridi legati da legami covalenti, due unità di monosaccaridi danno un disaccaride e i polisaccaridi si ottengono da catene di monosaccaridi o disaccaridi.

In base alla natura del gruppo CO classifichiamo i monosaccaridi: aldoso (aldeide), chetoso (chetone).

Molecola costituita da molecole di C e da un certo numero di gruppi ossidrilici. Le molecole sono in grado di ciclizzare cioè di formare di un anello. Il gusto dolce dipende dalla disposizione spaziale del gruppo OH.

Principalmente tutte le molecole biologiche sono chirali per cui si ha il C centrale chirale che dà disposizioni diverse dei gruppi funzionali.

Stereoisomeri → molecole con stessi legami e composizione ma differente arrangiamento spaziale: abbiamo proprietà chimico-fisiche diverse. Se devo separare due stereoisomeri lo posso fare perché le loro proprietà sono diverse, nel caso degli *isomeri* lo posso fare solo se metto in pratica metodi affinati (perché loro hanno stesse proprietà quindi non posso usare T di fusione, ebollizione ecc).

Molecole classificate attraverso la tipologia di simmetria.

Si considera una molecola, la sua immagine speculare e poi si applicano gli operatori di simmetria: riflessione, rotazione e traslazione, si vanno a vedere se senza uscire dal piano le due strutture delle due immagini speculari si sovrappongono, se non lo fanno sono due isomeri e quindi lì c'è un carbonio chirale (C con 4 costituenti diversi).

Le due forme di un oggetto chirale sono detti *enantiomeri*, stessa composizione, stesse proprietà chimico-fisica ma struttura geometrica diversa.

Miscela racemica: miscela che contiene entrambi gli enantiomeri in percentuale 50-50.

La separazione dei due enantiomeri si chiama risoluzione.

Configurazione R e S → nomenclatura + o -, stabilisce da che parte può ruotare la luce polare.

Ci sono anche i *diastereoisomeri*, sono due stereoisomeri che non sono l'uno l'immagine speculare dell'altro, contengono più di un stereocentro.

Possono avere configurazione uguale S,S R,R oppure configurazione diversa S,R → mesocomposto.

Nel caso di una reazione di tipo biotecnologica indirizziamo la sintesi verso uno degli enantiomeri.

Gli enantiomeri non possono essere separati per via convenzionale, quando si è in loro presenza li si fa reagire con una molecola purificata che a sua volta contiene un carbonio simmetrico, questo tipo di addotto (non è un composto stabile) genererà un diastereoisomero R,R e uno S,R; questi due possono essere separati.

Siccome ho generato un addotto posso rimuovere la molecola con cui ho fatto reagire i due enantiomeri.

Se il prodotto finale non è tossico lo si può usare come substrato, se questo ultimo step viene fatto tramite biochimica uno dei due enantiomeri non viene prodotto.

La sintesi enzimatica porta ad un eccesso enantiomerico del 100%.

Gli umani riescono a distinguere gli stereoisomeri tramite l'odore e il sapore.

Stereochimica dei carboidrati complicata, i monosaccaridi sono suddivisi in zuccheri con 5 atomi di C o 6 atomi di C e poi in aldosi e chetosi. Il n° degli stereoisomeri corrisponde a 2^n con $n = n^\circ$ C asimmetrici.

Monosaccaridi: $C_nH_{2n}O_n$

Gli zuccheri in funzione della loro struttura possono ciclizzare e dar luogo ad anelli chiusi. Il glucosio è spesso rappresentato nella sua versione ciclizzata. Una volta ciclizzata vengono distinti in anomeri α e β , in base a dove si piazza il gruppo OH sul C_1 . Gli anelli a sei possono assumere configurazioni diverse come a sedia e a barca.

Tutti i monosaccaridi e la maggior parte di disaccaridi sono definiti zuccheri riducenti, possono essere trattati con delle soluzioni di di Tollen, Fehling e Benedict in base al reattivo e possono dare luogo a redox.

È un modo per riconoscere la concentrazione di zuccheri utilizzati dalle cellule nei substrati.

Si definisce il potere riducente, questo dipenda dalla presenza di monosaccaridi aldosi o chetosi, e questo va a determinare la disponibilità degli zuccheri semplici sul substrato. Questo è legato anche al costo del substrato perché tanto ho più bisogno di zuccheri e tanto sarà più costoso il substrato. Esempi monosaccaridi: fruttosio, produzione totalmente enzimatica senza intervento del microorganismo; galattopiranosio che sta nelle membrane del cervello.

Disaccaridi: sono tutti legati da un legame glicosidico, è un legame covalente che porta alla polimerizzazione con eliminazione di molecola d'acqua. Per poter ricavare i zuccheri semplici dai dimeri bisogna operare con interventi che hanno bisogno di una spesa energetica più alta. Esempi: saccarosio, lo zucchero comune che contiene glucosio e fruttosio; lattosio, zucchero tipico del latte che contiene galattosio e glucosio.

Polisaccaridi: macromolecole costituite da monosaccaridi, costituenti principali dei vari substrati che andiamo a cercare come fonte di C.

Amido costituito da due macromolecole, l'amilosio (20%) e l'amilopectina (80%).

Il primo è un polimero lineare legato da legami α , è un polimero solubile proprio perché è lineare e semplice, la sua degradazione porta al maltosio e poi successivamente se questo dimero è rotto porta al glucosio. L'amilopectina è anche lei un poliglucosio ma ramificato circa ogni 20-25 unità con legami delle ramificazioni di tipo α -1,6.

Queste ramificazioni fanno sì che l'amilopectina sia insolubile in acqua.

L'amilopectina spesso è nella parte più esterna, in qualche modo con il fatto che ha ramificazione funge da protezione verso l'amido. Ciò che è meno solubile sta nella parte più interna. Ciò che è più facilmente degradabile viene protetto da ciò che lo è un po' meno in modo tale che la riserva sia protetta da eventuale degradazione.

La degradazione enzimatica è molto complessa nel caso degli amidi e della cellulosa, serve un intero team di enzimi che vadano ad attaccare le molecole in punti diversi → punto di vista economico costoso, meglio procedere per via chimica.

Un altro polisaccaride usato per stoccare riserve energetiche è il glicogeno, simile alla amilopectina perché ha una catena lineare con una serie di legami laterali, il glicogeno viene stoccato nei muscoli ed è una delle fonti che può essere degradato in maniera rapida in caso di necessità, se non viene degradato successivamente si trasforma in lipide. Il glicogeno è la prima fonte energetica in caso di richiesta da parte delle cellule, in particolare negli umani. Poi abbiamo la cellulosa, lunga catena lineare legata da legami β e quindi non siamo in grado di degradarlo (il nostro corpo ha perso la capacità di sintetizzare l'enzima in grado di degradare i legami β -1,4).

Le cellulose possono a loro volta impacchettarsi all'interno delle cellule, addirittura in arrangiamenti cristallini.

MEZZO DI FERMENTAZIONE

Insieme di sostanze che costituiranno l'ambiente ideale dal punto di vista nutrizionale per lo sviluppo dell'organismo selezionato e che stiamo facendo crescere.

Costituisce la fonte principale di C organico che servirà all'organismo, a seconda della tipologia di materiale di partenza e a seconda di quel che vogliamo produrre può rappresentare un costo importante.

Può essere materiale di scarto (e quindi si abbassano i costi) però in tal caso presenta alcuni limiti: può contenere elevato contenuto di acqua (vogliamo 1 kg di substrato ma se da un commerciante prendiamo tanta acqua in quel kg vuol dire che non stiamo guadagnando), può essere molto variabile, se derivata da prodotti agricoli può essere soggetta a stagionalità.

Esistono mezzi semplici, contengono ciò che è fondamentale per la crescita C, H, N, P ed esistono mezzi più complessi, a livello di produzione industriali in cui oltre agli elementi chimici abbiamo i fattori di crescita, vitamine, un po' di amminoacidi e tutto quello che va a favorire la crescita e lo sviluppo dell'organismo selezionato.

I mezzi liquidi sono preferibili rispetto a quelli solidi perché più facili da gestire, una fermentazione a substrato liquido richiederà meno spazio a pari produzione rispetto a fermentazione con substrato solido.

Tanto più puro è il mezzo di partenza che stiamo considerando e tanto migliore sarà il risultato, in termini di purezza e costi (se non ha impurezze verrà trattato di meno e quindi diminuzione di costi).

Dal punto di vista industriale non è importante quanto la materia prima sia la migliore o la più gradita da parte dell'organismo piuttosto si preferisce andare a vedere i costi della materia prima; non si sceglie la migliore ma quella che ci consente risultati ragionevoli ma a costi minori. **Scelta dettata dall'economia.**

Proprietà: fonte di C possibilmente disponibile, non troppo stagionale, non deve essere troppo lontana dal sito che dovrà utilizzarlo per evitare costi di trasporto, dovrà essere stoccata senza troppi problemi di degradazione dovuta all'attacco di altri organismi, non dovrà contenere grandi quantità di impurezze, dovrà in qualche modo essere un po' uniforme e avere una facilità di smaltimento dei rifiuti derivanti dalle materie prime.

Se ci sono dentro dei precursori che ci aiutano con il prodotto finale lo scarto risulta ancora più importante. I precursori sono spesso amminoacidi oppure altre molecole piccole.

Molti organismi industriali hanno due fasi di crescita nella coltivazione batch: la fase di crescita, o tropofase, e la fase di produzione, o idiofase. Spesso queste due fasi richiedono nutrienti diversi o proporzioni diverse degli stessi nutrienti. Il mezzo deve essere completo ed essere in grado di rispondere a questi requisiti.

Si sceglie un mezzo di fermentazione che derivi già da un trattamento di materie che contiene carboidrati, come amidi piuttosto che cellulose, per esempio trattamento di piante, cereali che avevano uno scopo produttivo diverso dal nostro. In questo caso si prendono cereali, mais, orzo, riso ecc e si trattano con l'obiettivo di estrarre le molecole che sono all'interno, in questa operazione di pretrattamento si fa un'opera di degradazione degli eventuali amidi e cellulose presenti per poter rompere il chicco ed estrarre ciò che è contenuto.

A seguito di questa operazione rimane sempre del liquame, ricchissimo di zuccheri perché la capsula che proteggeva il germe che conteneva l'olio è costituito appunto da cellulosa.

All'interno del liquido generato sono dunque contenuti tutti i carboidrati, addirittura già in parte degradati in monomeri e dimeri → buonissimo materiale di partenza su cui poi costruire il mezzo di fermentazione.

C'è il rischio che i costi per far sì che lo scarto diventi ottimo siano elevati a causa di tutti quei processi fatti ad esempio per purificarlo, in più ci sono anche i vincoli di legge perché alcuni scarti non possono essere riutilizzati.

Solitamente si scelgono scarti da più produzioni in modo tale da poter avere la stessa composizione finale ma da materiali di partenza diversi.

Esempio: (a) *corn steep liquor*, liquido che si ottiene dopo la separazione della parte solida a seguito del trattamento di mais per rompere i chicchi che verranno macinati e da cui si potrà estrarre l'olio.

Prendere mais → sticking, ammolamento in acqua e acido per degradare parte produttiva → sviluppo batteri lattici che degradano parte dei polisaccaridi, abbassano il pH → viene indebolita la parte protettiva del germe (parte più importante delle piante perché dal germe si genera una nuova pianta e quindi è ben protetto), ciò che lo protegge è a sua volta nutrimento una volta che questo cresce. Batteri lattici: degradativi e allo stesso tempo il mais stesso genera enzimi degradativi che porta alla degradazione della capsula. In questo modo i chicchi di mais sono facilmente separabili, si separa prima il solido ottenendo il liquido che contiene i polisaccaridi.

Derivando da un trattamento di prodotto agricolo il corn steep liquor conterrà anche vitamine, azoto, fattori di crescita e tutta una serie di altre sostanze utili. Il corn steep liquor è già un po' sterilizzante perché ha bassi livelli di pH e quindi più di tanto non si genereranno organismi non voluti, proprio perché è altamente acido va neutralizzato prima del suo uso. I melassi hanno una composizione ottimale (sono anche i più costosi) sia dal punto di vista di C che di tutti gli altri elementi utili.

(b) *Pharmamedia* deriva dall'essiccazione degli embrioni del cotone, contiene carboidrati, olio, ceneri ricche di Ca, Fe, Cloruri, P e solfati.

(c) *Scarti di distillazione*, è preparato filtrando via i solidi dal materiale lasciato dopo aver distillato cereali fermentati (mais o orzo) per whisky. Lo scarto rimane ricco di N, C, minerali e fattori di crescita e quindi può essere riutilizzato come materiale di partenza per produrre mezzi di fermentazione.

(d) C'è anche il trattamento di soia, questa viene utilizzata principalmente per fare l'olio di soia oppure per produrre margarina, quello che resta è il *soya bean meal* che ha un buon contenuto di N e C, può essere anche utilizzato come base di partenza di produzioni biotecnologiche; non è ricco quanto il corn steep liquor e l'azoto è molto complesso.

(e) *Melasso*, sicuramente uno dei mezzi di fermentazione migliori perché contiene una serie di vitamine, fattori di crescita che fa sì che sia una base di partenza quasi pronta.

(f) *Altri substrati* usati come materie prime sono alcol, acido acetico, metanolo e frazioni di petrolio greggio.

Bisogna controllare l'acqua, standardizzare la quantità di calcio, regolare pH, regolare minerali, eventualmente depurarla da sostanze. Si possono utilizzare altre fonti di C, proteine e fattori di crescita: possono essere utilizzati gli scarti dalla produzione delle noccioline, ricche di proteine e fattori di crescita, oppure viene utilizzato il blood meal, scarti di sangue essiccati, trattati con vapore, viene drenata via la parte liquida e la parte solida viene pressata, quest'ultima ha un colore cioccolato che però contiene l'80% di proteine quindi può essere utilizzato per fermentazione dell'organismo.

I rifiuti agricoli sono fonti interessanti perché contengono polisaccaridi, polimeri di zuccheri semplici che hanno due funzioni principali: riserve di combustibile e elementi strutturali extracellulari con siti di legame specifici per proteine particolari. Gli amidi contengono amilosio e amilopectina che possono essere degradati.

Le materie di partenza che contengono l'amido possono essere patate, mais, orzo, riso ecc, da questi posso degradare amilosio e amilopectina e poi utilizzarli. L'amido quando riscaldato tra i 55-82°C si gelatinizza e si dissolve in acqua e diventa soggetto all'attacco di vari enzimi. Prima della saccarificazione quindi il cereale macinato viene mescolato con acqua e riscaldato per gelatinizzare l'amido in modo tale da esporlo agli agenti saccarificanti come gli acidi diluiti o enzimi.

Le cellulose invece consistono in emicellulose e lignine, quest'ultime sono poco utili a fini fermentativi mentre le prime possono essere utilizzate come materiale di substrato per l'utilizzo in produzione biotecnologiche. Gli scarti lignocellulosici vanno degradati e possiamo degradarli via meccanica, irraggiamento, trattamento alcali o acidi ecc. Un'altra cosa che può essere utilizzata come base di partenza è il *sulfite liquor*, liquido che deriva dalla separazione delle fibre di cellulose ottenute per trattamento di materiali lignocellulosici dall'industria della carta, questa deve degradare la cellulosa perché servono fibre di una certa dimensione per produrre la carta attraverso trattamenti biochimici e batterici. Una volta ottenute le fibre di cellulosa delle dimensioni volute rimane un liquido fortemente acido che può essere separato, la parte solida va a fare la carta mentre la parte liquida dopo opportuna neutralizzazione è una buona base di partenza come mezzo fermentativo perché contiene molti monosaccaridi.

Generalmente le cellule per crescere hanno bisogno di energia, energia che deve essere presente al momento della necessità. Le cellule nel costruire le molecole, spesso polimeri che richiedono apporto energetico per la formazione di legami operano attraverso energia.

Il vettore energetico è l'ATP che insieme ad altri cofattori interviene durante le reazioni di biosintesi.

La cellula per ottenere l'ATP deve idrolizzare dei substrati, in particolar modo il glucosio ad elevato contenuto energetico.

Obiettivo primario: ottenere ATP in modo da avere disponibilità di vettore energetico e di poterlo usare rapidamente e in grandi quantità. L'idrolisi di substrati ad elevato contenuto energetico con obiettivo produzione di ATP è definito metabolismo, costituito da catene di reazione cataboliche e anaboliche cioè distruttive e costruttive strettamente correlate tra di loro. Facciamo questo tramite un'ossidazione inorganica.

Le reazioni redox sono efficienti, possono essere utilizzate in piccoli step, implicano trasferimento elettronico.

In funzione del meccanismo dei vari metabolismi che possono avvenire all'interno della cellula avremo vie metaboliche diverse che porteranno a fattori energetici diversi.

Quello che fa la cellula è: acetaldeide → acido acetico + ATP, l'acetaldeide per essere trasformata richiede la presenza di ADP in grado di accettare un fosfato e quindi l'acetaldeide sarà fosforilata. Il rilascio del fosfato con la formazione dell'ADP porta alla formazione del vettore energetico ATP e acido acetico. È un'ossidazione tipicamente biologica.

I vari microrganismi hanno a disposizione vari meccanismi metabolici e sono associati tra di loro in funzione della fonte energetica e in funzione della fonte di C. Per esempio se la fonte energetica è la luce abbiamo organismi fototrofi, se invece la fonte energetica è data da una redox abbiamo organismi chemiotrofi, gli autotrofi usano anidride carbonica come fonte di C mentre gli eterotrofi usano carbonio organico.

L'energia viene utilizzata durante la fase di anabolismo cioè la fase di costruzione delle molecole.

Il metabolismo microbico implica la presenza o l'accadimento di:

- Enzimi → ogni reazione metabolica è enzima catalizzata.
- Produzione dell'energia → serve per far avvenire le reazioni.
- Catena di reazioni chiamata glicolisi o di alternative → glicolisi maggiormente presente in tutti gli organismi.
- Ciclo di Krebs → presente in tutti i microorganismi in grado di respirare ossigeno, è uno dei cicli metabolici più importanti perché al suo interno ci sono molti prodotti di nostro interesse.

-Respirazione e fermentazione.

-Metabolismo dei lipidi e delle proteine → una catena degradativa che porta alla generazione del vettore energetico e poi una catena di costruzione che porta alla sintesi, nel caso di lipidi obiettivi storage e nel caso di proteine obiettivi costruzione cellule.

-Diversità delle vie metaboliche dei microrganismi.

-Anabolismo → parte biosintetica che ci interessa, avvengono reazioni che richiedono energia e che sono endoergoniche.

Reazioni di catabolismo: reazione idrolitiche, sono degradative, sono reazioni esoergoniche perché producono energia.

Sono tutte reazioni catalizzate, nessuno di questo step può essere effettuato senza la presenza di un catalizzatore ossia l'enzima. Le vie metaboliche che la cellula utilizza per svilupparsi sono determinate dagli enzimi, questi sono codificati da un codice genetico definito dal patrimonio genetico → vie metaboliche connesse quindi al patrimonio genetico. La codificazione degli enzimi è diversa e questo porta a un modo diverso di costruire/degradare molecole e di utilizzare/generare energia.

Via anaboliche (degradano) e via anfiboliche (costruiscono), alcune di queste sono specifiche mentre altre sono miste quindi sono in grado di produrre molecole che possono essere trasformate a loro volta in proteine o catene più lunghe e allo stesso tempo generano energia.

ENZIMI

Sono delle proteine estremamente specifiche perché hanno conformazioni molecolari molto particolari, hanno il sito attivo ossia il luogo in cui fanno avvenire la reazione. Possono essere intracellulari o extracellulari.

Operano come dei catalizzatori organici facendo avvenire le reazioni secondo step elementari diversi.

Non vengono consumati durante la reazione, sono estremamente specifici e spesso agiscono su uno specifico substrato. Il loro sito attivo ha una geometria specifica che deriva dalla complessità dell'enzima.

Enzima e substrato si coordinano, formano il complesso attivato che viene poi trasformato nel prodotto liberando l'enzima che poi può continuare il ciclo. Il sistema enzima substrato non necessariamente viene trasformato a prodotto ma l'enzima può essere liberato.

Il nome degli enzimi ci aiuta a capire cosa fanno: ossidoreduttasi → coinvolto nelle redox, transferasi → enzima coinvolto nel trasferimento di gruppi funzionali, idrolasi → idrolisi, liasi → in grado di rimuovere atomi senza idrolisi, isomerasi → riarrangia la struttura della molecole, ligasi → lega assieme due molecole.

Alcuni di questi enzimi sono molto specifici, molto di più dei catalizzatori convenzionali.

L'enzima catalizza reazione diretta, se voglio fare quella inversa ho bisogno di altri enzimi; questo vale per quasi tutti gli enzimi ma alcuni, come le proteasi, sono in grado di fare entrambe le reazioni in condizioni particolari.

Il sito attivo è costruito sia da una parte proteica, l'apoproteina, attorcigliata su se stessa all'interno del quale può essere alloggiato il substrato che da una parte non proteica, generalmente un metallo.

Si ha adattamento indotto, il substrato si riorganizza un pochino perché ha i legami elastici.

All'interno del sito attivo esiste un alloggiamento per i coenzimi che non sono parti proteiche ma sono molecole organiche, qua dentro avviene la redox, abbiamo bisogno di mettere lì dentro i due reagenti in contemporanea.

I coenzimi sono tutti quei vettori energetici: NAD^+ , portatore di elettroni, NADP, portatore di elettroni, ATP, vettore energetico.

Sulla superficie dell'apoproteina (apoproteina + cofattore) ci sono altri alloggiamenti, necessari a regolare gli enzimi; alcuni li hanno mentre altri no. La cellula cerca di regolare gli enzimi e l'attività catalitica per poter regolare le reazioni che avvengono all'interno della cellula stessa, la regolazione deve essere molto veloce.

I siti regolatori sono sempre siti che implicano interazioni con molecole semplici perché sono più facilmente trasportabili all'interno della cellula.

In fase di stasi normalmente quello che è pronto è la parte proteica perché fare proteine è complicato e richiede tempo, la cellula quindi prepara un enzima non attivo e lo attiva con un sistema semplice immediato, es. gli enzimi degradativi che ci degraderanno quando moriremo sono già presenti nel nostro corpo ma adesso che siamo vivi non sono attivi.

L'enzima esattamente come un catalizzatore può: prendere due substrati e orientarli perché reagiscono oppure prendere il substrato, riarrangia la molecola in modo da generare cariche imparziali che poi reagiranno oppure prende il substrato e lo forza in una geometria che non è gradevole per quella molecola e quindi lo porta ad uno stato di transizione che poi evolverà verso uno stato energetico più basso.

L'attività enzimatica può essere controllata:

1) geneticamente → viene controllata la sintesi di uno specifico enzima, la loro attività è regolata da sintesi ad hoc quando è necessaria (lo capisco grazie a segnali chimici mediati dagli ormoni che portano all'attivazione di vie sintetiche).

2) dal processo metabolico → regolatore dell'enzima e l'enzima a sua volta l'enzima fa da controllore sul processo metabolico. Gli enzimi allosterici sono controllati dai processi metabolici, questi enzimi hanno specificamente un sito diverso dal sito attivo su cui può alloggiare l'attivatore, molecola normalmente presente all'interno della cellula che va a legarsi all'enzima oppure se ne distacca per attivare o disattivare l'attività enzimatica. La proteina dell'enzima è così complessa, grande e rigida che piccole modificazioni anche in alcuni punti lontani dal sito attivo hanno conseguenze sulla geometria dell'enzima.

L'attivatore allosterico è piccolino, può essere uno ione metallico o una piccola molecola organica.

L'inibitore allosterico è il prodotto di una delle reazioni della catena metabolica → ci dice che siamo arrivati a concentrazione massima.

Reazioni redox utilizzate principalmente per produrre energia, coinvolgono carboidrati, proteine e lipidi che sono energeticamente ricche. Molecole che hanno una grande possibilità di essere ridotti perché hanno molti idrogeni. Le reazioni redox sono reazioni di trasferimento elettronico, l'ATP è in grado di conservare l'energia associata alla catena di trasferimento di elettroni. Sono reazioni cataboliche.

Nei sistemi biologici, gli elettroni sono spesso associati ad atomi di idrogeno: le ossidazioni biologiche sono spesso deidrogenazioni. Le reazioni biologiche sono principalmente redox e richiedono la presenza di altre molecole capaci di accettare o rilasciare elettroni, i coenzimi, per esempio il NAD forma ossidata e NADH forma ridotta.

Sono reazioni enzima catalizzate, portano alla degradazione del substrato e ad immagazzinare l'energia libera.

Nella respirazione aerobia, caratterizzata da un'efficienza molto grande, l'ossigeno è l'accettore finale di elettroni.

Nella respirazione anaerobica, che ha un'efficienza energetica piccola, l'accettore finale è una molecola inorganica (che non sia O_2).

Nella fermentazione, caratterizzata anch'essa da un'efficienza energetica piccola, l'accettore finale è una molecola organica.

In tutte queste si forma dell'ATP, la catena di reazioni è fatta dalla cellula affinché possa immagazzinare il vettore energetico che serve per le reazioni di biosintesi.

Tutte le redox sono effettuate tramite step elementari piccoli che trasferiscono una coppia elettronica passo a passo durante la catena di trasporto elettronico. Vi sono una serie di microrganismi che sono aerobi facoltativi cioè sono in grado di mettere in atto entrambe le vie in funzione delle condizioni ambientali esterne.

Tendenzialmente chi è aerobio tende a respirare per respirazione aerobia, diversamente, nel caso in cui le condizioni esterne non lo consentono, trasferiranno elettroni ad altre molecole inorganiche.

Nel caso di respirazione aerobia vs fermentazione la scelta dipende dalle condizioni operative, bisogna sapere quindi se il microrganismo può scegliere una via alternativa alla respirazione aerobia nel caso in cui si trovasse in ipossia.

È FONDAMENTALE saperlo perché altrimenti il prodotto finale sarà diverso. Il fatto di sapere di avere microrganismi che hanno vie alternative diverse porterà ad avere un processo più controllato.

Il reagente che fa avvenire le redox è il coenzima perché è lui in grado di accettare o donare gli elettroni, l'ATP è in grado di immagazzinare l'energia libera che deriva da questo processo nella sua struttura in modo tale da rilasciarla quando serve.

GENERAZIONE ATP: avviene attraverso la reazione di fosforilazione del substrato, ossia una reazione che genera una molecola di ATP attraverso un trasferimento diretto su una molecola di ADP di un gruppo fosfato.

Questo avviene a opera di un enzima: chinasi.

La generazione di ATP avviene quindi tramite fosforilazione dell'ADP che è presente nella cellula.

Fosforilazione: glucosio + ATP che viene fosforilato a dare ADP, questo poi in presenza di un gruppo fosfato che è stato rilasciato da un'altra reazione porta all'ATP.

All'interno della cellula la concentrazione delle varie specie di ATP è regolata da una K dell'equilibrio, questa deve essere mantenuta costante e la costanza deriva da un bilanciamento e quindi da un riarrangiamento delle singole specie. Mantenere costante un rapporto ci consente di regolare in modo più fine le singole concentrazioni.

Manteniamo costante $K \rightarrow$ sistema si arrangia affinché lei rimanga in equilibrio.

Chemiosmosi: è un processo biochimico che permette di utilizzare il gradiente elettrochimico di ioni H^+ per compiere lavoro cellulare che può essere usato per la sintesi di ATP. I trasferimenti di elettroni sono sempre piccoli, l'ATP è sempre presente perché o viene rilasciato o immagazzinato e la catena di trasporto elettronico nel caso dei procarioti è fatta nella membrana citoplasmatica mentre per gli eucarioti è fatta nei mitocondri.

Come ottenere ATP:

1) Degradazione dei lipidi, questi sono una forma di stoccaggio di glicerolo legato a tre acidi grassi.

Nel caso degli animali i lipidi sono una forma efficiente di stoccaggio, nelle piante invece è meglio stoccare substrato ad elevato contenuto energetico in amidi e cellulose. L'amido è più ossidato dei lipidi.

I lipidi si impacchettano per la loro struttura molecola in una cosa molto ridotta che ha un elevato potere riducente (possibilità di essere molto ossidato) \rightarrow contenuto energetico dei lipidi molto grande.

I lipidi non sono solubili in acqua perché sono molecole idrofobiche, quando si stoccano non portano molecole di acqua cosa che invece c'è nel caso di amido e cellulosa. Niente acqua \rightarrow pesano di meno.

Sono molecole estremamente ridotte.

2) Degradazione proteine ad amminoacidi e degradazione di amminoacidi ad acidi organici.

3) Degradazione dei carboidrati: esistono 4 vie diverse degradative che i microrganismi possono mettere in atto per degradare i carboidrati per immagazzinare energia.

i) EMP pathways: una delle vie preferenziali, è nota come **glicolisi**. Riduce glucosio (C_6) a piruvato (C_3), il sistema può operare sia in condizioni aerobiche che anaerobiche (in funzione di quali sono le condizioni e della natura dell'organismo). In condizioni aerobiche il piruvato generato può essere ulteriormente degradato a CO_2 e acqua grazie al ciclo degli acidi tricarbossilici. In condizioni anaerobiche una volta arrivato all'acido piruvico può avvenire una via fermentativa che invece comporta il trasferimento della coppia elettronica ad una molecola organica (fermentazione alcolica o lattica).

ii) Pentosi fosfato: porta alla degradazione di zuccheri C_6 a zuccheri più piccoli (C_3 , C_5) e anche a zuccheri più grandi come C_7 .

È una via che può essere scelta da batteri o da lieviti per portare apporto energetico in forma di NADPH₂.

iii) Via scelta solo dai Pseudomonas o da qualche fungo, è in grado di degradare in via anaerobica il glucosio e portare alla formazione di gluconato e acido gluconico.

iv) Messa in atto da batteri lattici, è la via della chetolasi che porta alla formazione di pentosi associati alla produzione di etanolo, acido lattico, acido acetico e CO_2 .

GLICOLISI

È l'ossidazione del glucosio in acido piruvico attraverso una serie di passaggi enzimatici con scopo generazione vettore energetico. È molto importante perché è presente negli eucarioti e procarioti.

È una sequenza di molte reazioni controllate da enzimi specifici allosterici (nel disegno l'asterisco indica enzimi allosterici e anche vie irreversibili). Questa via può operare in condizioni aerobiche o anaerobiche e consiste in una sequenza di 10 reazioni catalizzate: avviene con fosforilazione del glucosio e poi con le reazioni di degradazione.

Possiamo suddividerla in due parti: prima parte in cui 2 molecole di ATP vengono consumate perché servono a fosforilare le molecole che saranno degradate, seconda parte chiamata ramo della conservazione dell'energia in cui vengono prodotte 4 molecole di ATP durante la fase di defosforilazione. La glicolisi è in grado di fornire quindi solo 2 molecole di ATP nette, per cui non è un processo particolarmente efficiente.

Esistono vie alternative alla glicolisi, come quella dei pentosi, sono vie che alcuni organismi possono mettere in atto e che portano a prodotti diversi.

La via dei pentosi opera insieme alla glicolisi e quindi può essere copresente, gli organismi che danno luogo alla produzione dei pentosi portano alla sintesi di eritrosio, fruttosio e altri zuccheri di interesse industriale.

Dobbiamo cercare enzimi in grado di sovraintendere a queste trasformazioni, estrarli dalle cellule e utilizzarli come

catalizzatori.

Dobbiamo conoscere le vie metaboliche dell'organismo e le condizioni in modo da gestirle durante la reazione.

Lo *zymomonas* può prendere una via diversa rispetto a quella della glicolisi, arriva al piruvato e può dare fermentazione alcolica.

Per i lattobacilli abbiamo una via totalmente diversa, ci sono batteri lattici che mettono in atto entrambe le vie.

Dobbiamo conoscere quali batteri operano solo un ramo o entrambi e come fare a spingere una reazione piuttosto che un'altra.

DOPO LA GLICOLISI

Se i microorganismi che abbiamo selezionato per fare i processi passano per la via della glicolisi, una volta arrivati al piruvato accade che possono esserci principalmente 3 vie: produzione di etanolo quindi fermentazione alcolica (l'acido piruvico è convertito in acetaldeide che è poi ridotta in etanolo), fermentazione lattica con produzione di acido lattico e respirazione con il ciclo di Krebs.

IL CICLO DI KREBS

È un processo metabolico utilizzato per la produzione di energia attraverso l'ossidazione di molecole di Acetil-CoA ad anidride carbonica con il trasferimento di elettroni ai coenzimi.

Tutti gli acidi coinvolti sono di interesse industriale: citrico, succinico, malico, fumarico ecc...

La glicolisi è strettamente connessa al ciclo di Krebs: il glucosio viene fosforilato progressivamente, arriviamo a piruvato con consumo e poi generazione di ATP, catalisi esercitata dagli enzimi, dal piruvato generiamo l'acetil coenzima A il quale ci porterà al primo membro del ciclo di Krebs che è il citrato.

Se c'è tanto acido citrico significa che lo stiamo accumulando e non viene degradato, il ciclo quindi si ferma perché non c'è bisogno di ATP. Nel momento in cui ho bisogno di energia il ciclo riparte.

L'acido citrico è un metabolita primario, noi vogliamo produrlo e accumularlo, il processo deve essere condotto a due stadi con due condizioni operative diverse, nel primo stadio lascio che il citrato segua la natura mentre nel secondo stadio devo convincere che l'organismo abbia bisogno di energia e quindi dell'acido citrico, lo faccio bloccando la reazione successiva perché lì il citrato viene degradato.

Dopo che ho bloccato questa via si accumula l'acido citrico, che è il regolatore allosterico, e il processo di glicolisi si inibisce (bloccandosi) e devo fare in modo di rimuovere l'inibizione della fosfofruttochinasi ad opera del citrato.

Quindi devo convincere l'organismo che l'acido citrico non è stato accumulato e allo stesso tempo devo chiudere il ramo del ciclo affinché l'acido citrico venga accumulato.

Lo faccio modificando il substrato in modo che vada ad inibire l'enzima e ad accumulare l'acido citrico.

Se chiudo solamente il ciclo di Krebs il microorganismo muore però modificando il substrato consento all'organismo di consumare un po' di citrato, di prendere una via metabolica alternativa e chiudere il ciclo con un pezzetto più piccolo, in questo modo sopravvive. Da ogni molecola di NADH si generano 30 molecole di ATP mentre dal FADH 2.

RESPIRAZIONE ANAEROBICA

Calcolo potenziale redox: via nitrati è 0,42 mentre via O_2 è 0,82 → ATP preferibile produrre con ossigeno.

In termini di apporto energetico è meno efficiente, analogamente solfati (che portano a idrogeno solforato) e carbonati (produzione di metano e CO).

Ci sono una serie di batteri rari che usano come accettori finali molecole particolari come il Fe o il Mn.

Aerobia vs anaerobia

La via aerobia è sempre più efficiente per la cellula che la via anaerobia, i processi aerobi possiamo paragonarli a processi di combustione perché fortemente esotermici. I processi anaerobi sono considerati invece trasformazioni perché qui trasformiamo il substrato in qualcos'altro.

FOTOSINTESI

L'ATP è il vettore energetico anche per gli organismi fotosintetici, questi però sono in grado di ottenere ATP utilizzando la luce solare e poi fissando C in molecole organiche. La fotosintesi prevede una parte che dipende dalla presenza di luce e dalla sua conversione in energia chimica e da un secondo step, quello di sintesi che è indipendente dalla presenza di luce solare, che porta a fissare il C sulle molecole organiche.

PROTEINE

Genetica: studio dei geni, di come portano le informazioni, di come queste sono espresse e di come si replicano i geni.

Gene: segmento di DNA che codifica un prodotto funzionale, solitamente una proteina.

Genoma: tutto il materiale genetico nella cellula.

Genomica: studio molecolare dei genomi.

Genotipo: gene di un organismo.

Fenotipo: espressione del gene

Le proteine sono viste come pacchetto di amminoacidi, alcuni amminoacidi sappiamo sintetizzarli mentre altri no (questi definiti amminoacidi essenziali, vanno assunti con la dieta). Gli amminoacidi possono essere dei buoni materiali di partenza come per esempio per i farmaci.

Acidi nucleici: costituiscono il nostro patrimonio genetico che è proprio l'informazione base che consente la sintesi delle proteine che ci caratterizzano. Sono composti da monomeri che sono nucleotidi fatti da 3 componenti: uno zucchero a 5 C, un gruppo fosfato e una base azotata.

Gli acidi nucleici si suddividono in due tipi: ribonucleici, come l'RNA, oppure desossiribonucleici come il DNA.

Il DNA è costituito da due filamenti, due polimeri costituiti da base azotate accoppiate tra di loro (DNA

accoppiamento: guanina citosina, adenina timina; RNA: guanina citosina e adenina uracile).

L'accoppiamento è rigido e caratteristico perché deriva da un legame che si genera dovuto al fatto che esiste una tautomeria cheto-enolica (equilibrio in cui sono interessati un aldeide/chetone che diventano enoli tramite lo spostamento del gruppo ossidrilico), a seconda della conformazione del tautomero il legame è possibile oppure no, ho accoppiamento proofreading cioè possono accoppiarsi soltanto i tautomeri che hanno la conformazione corretta e quindi non è possibile avere accoppiamenti diversi.

L'insieme base azotata + zucchero costituisce nucleoside, questo viene fosforilato e ciò porta al nucleotide, la ripetizione del monomero caratteristico costituisce poi il polimero DNA o RNA.

Coppie antiparallele tra di loro, questo porta ad una struttura conformazione molto rigida che mantiene distanze tra il ribosio in C₁ per tutti gli accoppiamenti di 1.08 nm (regola di Chargaff), consente ad avere un avvolgimento ad alpha-elica.

La distribuzione delle basi azotate è abbastanza simile, non uguali, tra le varie specie con differenze non particolarmente elevate.

La sequenza e ripetizione delle basi presenti nelle due catene porta alla struttura primaria del DNA, che costituisce poi l'informazione genetica. La struttura primaria si avvolge nella struttura secondaria ad alpha-elica.

L'avvolgimento in questa struttura porta ad avere sulla parte esterna gli zuccheri e le posizioni fosforilate mentre all'interno sono mantenute le basi (con il loro accoppiamento) → modo per proteggere l'informazione più importante ossia il patrimonio genetico.

Struttura terziaria: nel caso dei batteri la struttura è circolare mentre negli eucarioti è ad alpha elica, protetta poi dalla membrana cellulare. Nel caso dell'RNA (e in particolare in quello transfer) esiste struttura terziaria che porta a struttura a L, l'RNA transfer ha il compito di trasferire gli amminoacidi all'interno dei ribosomi, ha bisogno di punti diversi e di siti diversi su cui alloggiare cose diverse o sulla superficie dei quali presentare informazioni diverse.

REPLICAZIONE DEL DNA

Le due catene vengono aperte e si forma una forchetta di replicazione, una catena viene replicata in continuo dal DNA polimerasi mentre l'altra catena viene replicata pezzetto per pezzetto non alloggiando le basi per continuità ma costruendo piccoli frammenti che poi vengono legati assieme da un DNA ligasi.

È l'RNA primer che si preoccupa dell'inizio della duplicazione del DNA.

Nel caso della sintesi del DNA (e anche nel caso della sintesi delle proteine) siamo in presenza di una reazione che richiede energia.

Le cellule accoppiano una reazione endoergonica con una o più reazioni esoergoniche in modo tale che la somma totale di energia libera sia favorevole alla formazione dei legami richiesti, è il fosfato che fa avvenire la reazione.

La reazione esoergonica che viene associata è la fosforilazione con liberazione di un fosfato, le cellule operano attraverso energie libere, additive in presenza di reazioni con intermediario e quest'ultimo è il gruppo fosfato che viene dall'ATP.

SINTESI PROTEICA

Il DNA contiene le informazioni per la sintesi delle proteine.

Le proteine sono costituite da 20 amminoacidi, siamo dunque in presenza di un codice di 20 lettere che parte da un codice a 4 lettere (i 4 nucleotidi). Il problema deriva dalle possibili combinazioni, il codice di trasmissione a 20 lettere è un codice degenerare. Abbiamo 64 combinazioni, molto più abbondanti di quelle che sarebbero necessarie.

L'RNA messaggero è tradotto in codoni cioè 3 nucleotidi, 3 basi corrispondono ad un codon e ogni codon corrisponde ad un amminoacido. (Ogni codone consiste di 3 nucleotidi, corrispondenti ad un singolo amminoacido)

La traslazione del mRNA inizia sempre con un codon d'inizio specifico ad esempio AUG cioè la metionina e la traslazione si ferma al codone di stop, detto anche codone di terminazione, che è una tripletta di base che non codifica nessun amminoacido e che non hanno alcun significato: UAA, UAG, UGA.

Ho 61 codoni in grado di identificare 20 amminoacidi, la codifica viene fatta tramite l'RNA messaggero costituito da una tripletta identificativa che porta su di sé un amminoacido, e un RNA transfer.

Quest'ultimo ha una struttura terziaria con forma a L in cui la tripletta deve andare a incastrarsi nella sequenza stabilita dal mRNA, è costituito dall'anticodon che si trova sul braccio lontano rispetto al binding site dell'amminoacido, questo invece si trova vicino al sito fosforilato.

Il transfer viene sintetizzato da enzimi specifici, ogni transfer è quindi in grado di portare su di sé solo l'amminoacido identificato dal suo anticodon.

Un amminoacil-tRNA è un tRNA amminocilato con un amminoacido, reazione catalizzata da uno specifico enzima amminoacil-tRNA sintetasi che accoppia l'amminoacido corrispondente all'estremità di ciascun tRNA.

Sono in presenza di 20 amminoacil-tRNA sintetasi caratteristici per ciascun amminoacido che andrà a costituire le proteine, per ciascuno di questi c'è un'enzima specifico. L'amminoacido deve contenere un gruppo fosfato nella molecola. Gli enzimi che sintetizzano gli amminoacil t-RNA sono proofreading cioè sono in grado di riconoscere i legami e idrolizzare eventuali legami formati nel momento in cui l'amminoacido caricato dal transfer non è quello corretto. Si fa circa un errore ogni 104 amminoacidi.

MECCANISMO

Il tutto parte dall'enzima, l'enzima ha tre alloggiamenti diversi: per il tRNA, per l'ATP e per l'amminoacido.

La reazione inizia e l'enzima è in grado di caricare e fosforilare l'amminoacido, una volta avvenuta la fosforilazione vengono rilasciati due gruppi fosfato; questo perché l'energia richiesta per questo tipo di reazione è molto alta ed è necessario rilasciare due gruppi per avere sufficiente energia affinché la reazione avvenga. L'amminoacido viene così attivato cioè fosforilato e a questo punto l'enzima è in grado di alloggiare il tRNA specifico di questo amminoacido. A seguito dell'alloggiamento avviene l'interazione tra transfer e amminoacido e viene rilasciato l'ultimo gruppo fosfato, a questo punto l'amminoacido è caricato sul transfer che poi esce e viene rilasciato dall'enzima e portato ai ribosomi.

La trascrizione avviene nelle unità ribosomiali che sovrintendono la sintesi delle proteine; viene portato l'amminoacido iniziale, viene poi portato un ribosoma in grado di leggere la tripletta successiva e quindi alloggiare il transfer corretto. Avviene la formazione del legame peptidico tra i due amminoacidi con rilascio del transfer che poi torna nel riciclo. Questo avviene per un po' di volte fino a quando non interviene il codone di stop.

Il ribosoma polimerizza gli amminoacidi e porta ad una catena in cui la sequenza è stata stabilita dal patrimonio genetico (ribosoma costruisce amminoacidi quindi costruisce struttura primaria).

Successivamente la proteina può essere glicosilata o fosforilata in funzione del suo processo, fanno così un processo di finitura. Le proteine sono strutturali, fanno tessuti, funzionano come ormoni, mantengono il pH costante all'interno delle cellule, sono in grado di trasportare nutrienti, sono in grado di assistere il sistema immunitario e possono essere degradate a scopo energetico.

STRUTTURA AMMINOACIDO:

Amminoacido: **la funzione amminica e la funzione carbossilica devono stare sullo stesso lato dello stesso carbonio**, altrimenti non è un amminoacido. Abbiamo un carbonio centrale chirale sul quale sono presenti contemporaneamente la funzione acida (COOH) e la funzione amminica (NH₂) dopodiché è presente un H e una catena laterale. La catena laterale è ciò che differenzia i singoli amminoacidi.

Il fatto di portare su di sé sia il gruppo amminico che quello carbossilico consente all'amminoacido la possibilità di delocalizzare la carica, l'amminoacido quindi si presenta in forma carica perché l'O carbossilico ha una carica parziale

negativa mentre l'N amminico ha una parziale carica positiva e assieme generano un piccolo dipolo elettrico. Il punto isoelettrico è il valore di pH in cui l'amminoacido è neutro. Gli amminoacidi possono essere classificati in queste categorie: non polari alifatiche, aromatiche, polari non cariche, cariche positivamente o cariche negativamente. Il fatto di poter delocalizzare la carica porta a un pH acido che risulta in un'acidità più bassa e porta a un valore di pH basico che porta ad una minore basicità quando l'amminoacido si trova nelle due forme. Gli amminoacidi sono 20 e 9 sono definiti essenziali perché non possono essere sintetizzati da noi. Il 15% della cellula è costituita da proteine. Le proteine hanno tantissime funzioni, per esempio gli ormoni sono proteine che mediano i processi di informazione e scambio all'interno della cellula; neuropeptidi, mediatori di dolori; funzioni protettive come il veleno dei funghi o dei serpenti.

FORMAZIONE LEGAME PEPTIDICO

La polimerizzazione avviene tra un gruppo COOH di un amminoacido e un gruppo NH₂ dell'amminoacido vicino. È formato con una condensazione di una molecola d'acqua; è un legame forte e covalente che può essere idrolizzato e ha bisogno di energia per essere scisso.

La rottura del legame peptidico può avvenire per esempio scaldando in ambiente acquoso.

La sintesi delle proteine avviene per reazioni di condensazioni successivi, il legame che si forma è estremamente rigido. È un legame molto particolare che porta ad un irrigidimento sul piano della struttura primaria della proteina.

Al di fuori del piano attaccate si trovano i residui R, cioè le catene laterali tipiche di ogni amminoacido.

Struttura rigida in cui non è possibile rotazione. Il legame peptidico essendo un legame planare e potendo fare risonanza ha carattere quasi di doppio legame e quindi non può portare ad alcun tipo di movimento, stabilisce la posizione delle catene laterali in maniera predefinita.

Questo irrigidimento costituisce la struttura primaria della proteina.

Le catene R dei residui interagiscono tra di loro con legami non forti, ad esempio con interazioni elettrostatiche o forze di Van der Waals o legami idrogeno, e questo porta ad una conformazione nel piano, possono attorcigliarsi o arrotolarsi ad esempio.

Una volta che avvengono queste interazioni, che sono univoche in quanto la posizione delle catene è stabilita, abbiamo la formazione della struttura secondaria. Nel caso di enzimi possiamo addirittura avere strutture quaternarie.

Le cellule operano per energia libera, le cellule sono isoterme quindi funzionano a T e P costante.

Hanno bisogno di formare legami utilizzando energie libere, per poter utilizzarle devono trovare il modo di generare un intermedio comune.

Nel caso di una reazione chimica sequenziale si può calcolare sommando i ΔG se c'è intermediario, l'energia libera di Gibbs consente di prevedere la direzione delle reazioni chimiche, la loro esatta posizione di equilibrio e la quantità di lavoro che in teoria possono svolgere a T e P costanti. Le cellule eterotrofe acquisiscono energia libera dalle molecole di nutrienti mentre le cellule fotosintetiche la acquisiscono dalla radiazione solare assorbita.

Nel caso delle cellule l'intermedio comune è costituito principalmente dal fosfato.

Le reazioni devono avvenire proprio grazie all'intermedio.

Esempio: reazione glutammato + ammoniaca catalizzata dall'ammoniaca.

Il glutammato viene fosforilato e l'ATP si dissocia dando ADP e il fosfato, questo non rimane libero ma va a fosforilare una parte della molecola; si forma un intermedio che si trova sull'enzima.

Il sito di alloggiamento della molecola che deve essere trasformata e il sito di alloggiamento dell'ATP devono essere vicini perché servono a fare in modo che i due reagenti, in questo caso glutammato e ATP, siano vicini e orientati; a questo punto uno dei fosfati reagisce, in questo caso particolare con il gruppo dell'acido glutammico, si forma ADP ma il P non è libero nell'ambiente ma si trova su una molecola che è proprio l'intermedio comune; una volta che questa molecola si è formata cambia la conformazione e cambia ciò che è legato dall'enzima, nel frattempo arriva l'ammoniaca che reagisce con il gruppo liberando un fosfato con formazione della glutammina → adesso energie libere additive.

È il modo in cui le cellule operano per fare le reazioni che richiedono apporto energetico.

Quando il fosfato viene rilasciato la situazione energetica dell'ATP è molto alta: 3 gruppi fosfato vicino all'altro con cariche negative e ingombro sterico alto, un rilascio del gruppo fosfato porta ad una molecola che può fare risonanza e ad una molecola che abbassa il contenuto energetico, molecola più stabile una volta rilasciata perché può essere idratata e quindi la sua carica è bilanciata dall'ambiente → questo tipo di reazione è favorito.

Il fatto che possa staccarsi dall'ATP e che possa andare a fosforilare *immediatamente* è il motivo per il quale è favorevole e facile che possa avvenire il trasferimento dall'ATP ad un'altra molecola per formare l'intermedio comune → modo con cui il vettore energetico può far trasferire energia.

Una volta fatta avvenire la reazione si ritorna alla riformazione all'ATP attraverso il rilascio del fosfato, questo viene normalmente associato all'ATP.

Il fosfato è stabilizzato quando viene rilasciato da motivi di delocalizzazione e di risonanza ma immediatamente l'equilibrio che deve esistere tra le tre specie deve essere effettuato per cui si lega di nuovo all'ATP nonostante questa situazione sia energeticamente più alta rispetto all'altra.

Normalmente l'ATP nelle cellule è spesso salificata con il magnesio.

La struttura delle proteine è determinata dalla sequenza degli amminoacidi, queste a causa delle interazioni delle catene laterali hanno una conformazione ben definita.

La denaturazione è il processo di dispiegamento della proteina: può essere influenzato dal calore, pH o composti chimici. Le proteine si possono associare in strutture secondarie e terziarie, talvolta anche quaternarie (in cui ho interazione tra 2 catene polipeptidiche). La struttura secondaria è di due tipi: α -elica o foglietto β ; le due strutture finali raggiunta dalla proteina hanno proprietà diverse.

α -elica → riarrangiamento a spirale, tipico delle proteine fibrose (capelli, corna, unghie)

Foglietto β → si formano dei nastri che poi a loro volta si arrangiano in forma di proteina globulare; si formano due strutture rigide che vengono associate tra di loro e interagiscono in forma parallela o antiparallela. Hanno una struttura rigida con legami idrogeno.

La funzionalità della proteina dipende dalla conformazione delle proteine stesse.

Tutte le proteine hanno una conformazione di utilità, hanno una struttura dalla primaria in su legata all'utilizzo da parte della cellula di quel tipo di proteina, è la conformazione a miglior livello energetico.

La selezione naturale ha eliminato conformazioni che non avessero una funzione specifica.

Per funzionare le proteine devono interagire con altre molecole, esse possono legarsi ai ligandi (molecole bersaglio che fungono da recettori) con il binding site, che consiste in una cavità formata da uno specifico arrangemento di amminoacidi.

A partire da sequenze primarie simili si ottengono sequenze 3D simili, queste proteine appartengono alla stessa famiglia; esse sovrintendono a necessità cellulari simili ma attraverso meccanismi diversi.

Le proteine possono associarsi e dar luogo a strutture diverse in modo diverso, nel caso delle actine (proteine dentro fibre muscolari o citoscheletro) sono il risultato di arrangemento di molecole di actine a loro volta arrotolate su se stesse in forma di α -elica.

Le proteine fibrose corrispondono a filamenti e sono presenti nelle parti strutturali, vengono utilizzate anche come proteine di contatto con la parte esterna della cellula o proprio tra le cellule.

Un esempio di proteina fibrosa: cheratina, collagene, seta della ragnatela dei ragni (fibre di una resistenza molto elevata, dal punto di vista meccanico seta > acciai).

Proteine globulari, estremamente compatte, il loro riarrangiamento si manifesta in una struttura terziaria a forma di palla che dipende anche dall'ambiente in cui si trova, arrangemento tipico degli enzimi. Possono assemblarsi in dimeri o tetrameri. Tanto più è complicato l'enzima e tanto più è la sua funzione ma tanto più sarà complesso il suo arrangemento terziario che spesso si manifesta anche in una struttura quaternaria.

Tetramero dell'emoglobina → costituito da 4 subunità uguali 2 a 2 con caratteristiche un po' diverse.

Struttura molto complessa generata con lo scopo di avere un sito molto piccolo ma molto specifico e molto rigido tale per cui piccole variazioni sul sito portano a modifiche conformazionali a lungo raggio. Le 4 subunità dell'emoglobina danno luogo a questo riarrangiamento spaziale con l'obiettivo di generare un sito centrale, costituito da ioni ferro e in cui ho residuo della molecola dell'emoglobina, dall'altra parte c'è un sito aperto in grado di legarsi all'ossigeno molecolare e quindi a sovrintendere alla respirazione.

Quando il sito è collegato ad ossigeno ha una conformazione, nel momento in cui l'ossigeno viene rilasciato, il sito cambia conformazione e la conformazione planare quadrata del ferro è deformata, il fatto di avere una modifica alla conformazione porta a una tensione molecolare che risente tutta la struttura, rilascio CO_2 e si può rifare legame tra ferro e ossigeno. L'alloggiamento del substrato viene generato in una conformazione estremamente rigida in modo tale che l'interazione sia univocamente definita.

ANTICORPI o immunoglobuline

Modo in cui la cellula ha per difendersi dalla presenza di antigeni, virus, polline e organismi infestanti.

Hanno una struttura ad Y con due binding site all'estremità superiori, sono fatte da proteine ricche di gruppi contenenti zolfo, sono in grado di dare legami S-S.

La parte superiore è la parte in grado di riconoscere l'antigene ed è specifica per lui, quando l'antigene è legato comporta una modificazione di tipo elettrostatico perché i legami si tensionano e cambiano gli angoli di legami, abbiamo modificazioni di interazioni Van der Waals che risultano in modificazioni molecolari.

Questo tipo di interazione porta a modificazioni sul sito di riconoscimento e portano ad un'interazione forte che attiva tutta la catena di degradazione dell'antigene.

Le proteine possono essere denaturate, possiamo cioè srotolarle e ciò comporta la perdita delle loro funzioni. Abbiamo distruzione della struttura secondaria, terziaria e quaternaria.

Per arrivare alla distruzione della struttura primaria dobbiamo operare lavorando pesantemente energeticamente parlando (dobbiamo rompere legami sigma). La denaturazione delle proteine implica la rottura dei legami più deboli per arrivare alla struttura primaria, questa rimane però inalterata.

La denaturazione può avvenire tramite variazioni di pH, sali, calore, agitazione meccanica.

Le proteine e quindi gli amminoacidi hanno all'interno della cellula una serie di obiettivi metabolici.

Quando il pacchetto amminoacidico necessario alle cellule è raggiunto ci troviamo con un eccesso di proteine perché introdotte con la dieta. Le proteine in eccesso non vengono eliminate ma vengono conservate come fonte di amminoacidi. Le proteine innanzitutto vengono deaminate cioè viene rimosso il gruppo NH_2 , in modo che si torni a catene contenenti essenzialmente C, dopodiché queste vengono utilizzate dalle cellule in modo diverso per esempio possono essere convertite in glucosio. Gli amminoacidi possono essere trasformati in acidi grassi ed essere stoccati nei tessuti adiposi andando a fare scorta di grassi. Le proteine degradate alla fine hanno lo stesso scopo dei carboidrati: fornire glucosio che poi può essere trasformato nel vettore energetico ATP.

LIPIDI

I lipidi hanno un sacco di funzioni all'interno delle cellule principalmente a scopo di conservazione dell'energia, nel caso degli animali in forma di grasso mentre nelle piante sotto forma di oli contenuti nel germe della pianta.

Vengono degradati nel momento in cui è necessario avere a disposizione glucosio. I lipidi non sono solubili in acqua.

Nelle membrane cellulari sono presenti fosfolipidi, i costituenti principali della membrana, che hanno un gruppo polare che può interagire in ambiente acquoso, e una catena apolare, costituita da acidi grassi e lipidi, insolubile in acqua; questa particolare struttura consente alla membrana di avere una doppia caratteristica: possibilità di interagire con ambiente acquoso principalmente verso l'esterno o interno e fare anche da barriera tra l'interno e l'esterno.

Avere una parte di lipidi fa sì che la quantità d'acqua entri in modo determinato.

La membrana cellulare contiene anche steroli.

I lipidi sono spesso cofattori, spesso sono in grado di trasportare elettroni, sono in grado di assorbire luce come nel caso dei pigmenti perché hanno doppi legami e quindi possono interagire con la luce oppure hanno la funzione di ancorare le proteine di membrana e mantenerle nella membrana stessa.

Tutta la categoria degli ormoni sono o lipidi o derivati da lipidi.

Gli acidi grassi naturali possono essere solidi o liquidi, hanno caratteristiche comuni: sono lineari, numero pari di C, non sono ramificati e hanno sempre un doppio legame di tipo CIS (gli insaturi, i saturi non hanno doppi legami).

Il fatto di essere solidi o liquidi dipende dall'impacchettamento delle molecole.

Identificati con: primo numero mi dice n° di atomi di C, secondo numero dice n° doppi legami e il delta corrisponde alla posizione del doppio legame.

I lipidi hanno scopo principalmente di **stoccaggio** di qualcosa che può essere utilizzato per produrre energia, che può essere trasformato e che sia in grado di dare vettore energetico.

I lipidi sono idrocarburi e hanno la stessa funzione degli idrocarburi fossili quando sono utilizzati a scopo energetico; hanno stesso risultato di una combustione di un combustibile fossile → acqua, CO_2 e tanta energia liberata (reazione esoergonica).

La maggior parte dei lipidi presenti nella nostra dieta sono i triacilgliceroli (detti anche trigliceridi) e rappresentano una fonte energetica molto grande, sono degradati dagli acidi della bile.

I trigliceridi sono composti da tre acidi grassi ciascun legato ad un singolo glicerolo con un legame estere.

Gli acidi grassi possono avere gradi di impacchettamento maggiori o minori, quelli saturi possono dar luogo a un maggior effetto di packaging e possono raggiungere quasi una struttura cristallina; gli insaturi a causa della presenza del doppio legame danno luogo a un minor impacchettamento perché il legame doppio CIS introduce rigidità.

I trigliceridi sono le molecole che le nostre cellule preferiscono stoccare; hanno una serie di vantaggi: prima di tutto possono essere facilmente degradati in modo tale da potere essere trasformati in zuccheri con un apporto energetico più grande, hanno un grado di riduzione maggiore degli zuccheri quindi la loro ossidazione comporta un maggior uso di ATP, essendo idrofobici possono essere stoccati senza portare molecole di acqua.

I grassi e l'olio sono stoccati negli adipociti.

I lipidi hanno funzione di stoccaggio ma anche di **protezione**, sono i costituenti principali delle membrane cellulari, queste sono costituite da fosfolipidi affacciati tra di loro in modo tale da avere all'esterno la parte idrofila e mantenere all'interno la parte idrofobica. La membrana è definita bilaminare costituita cioè da due strati.

I lipidi di membrana e i lipidi di stoccaggio sono simili ma con strutture diverse: membrana hanno sempre gruppo polare mentre stoccaggio no, entrambe possono essere costruite da tre parti, una che costituisce la parte di base fatta da glicerolo o sfingosina, una parte costituita dalle catene alchiliche e poi solo nei lipidi di membrana abbiamo i gruppi polari, principalmente gruppi di fosfato.

Un'altra funzione dei lipidi è quella dei **messaggeri**, come gli ormoni, possono andare da un tessuto all'altro portando informazioni che poi scatenano risposte derivanti da segnali extracellulari. Hanno obiettivo riconoscimento e risposta a sollecitazioni esterne. Informazioni trasmesse attraverso reazioni semplici, come reazioni di idrolisi, mediamente tutti i prodotti di idrolisi hanno a che fare con un sistema di informazioni con obiettivo regolazione di un processo metabolico, entrambe le parti della molecola attivano le attività di enzimi che hanno a che fare con il processo.

Steroli → lipidi presenti nelle membrane degli eucarioti, sono costituiti da un nucleo molto rigido in cui sono fusi 4 anelli a cui è legata una catena che recepisce le informazioni esterne.

I nuclei sono quasi planari e relativamente rigidi perché gli anelli fusi non permettono la rotazione.

Dagli steroli derivano il testosterone, estradiolo, cortisolo (prodotto dalle ghiandole surrenali) e steroidi sintetici.

Altra grande categoria dei lipidi sono tutte quelle molecole biologiche che contengono unità di isoprene, sono tipiche nelle vitamine. Non sono solubili.

Le vitamine sono sempre assunte assieme ai grassi, hanno bisogno di essere trasportati tramite lipidi.

Le vitamine a loro volta funzionano da messaggeri, come il β carotene, questo è un precursore della vitamina A e quest'ultima ha due effetti: visione e protezione delle cellule epiteliali.

Da una parte dà un segnale che riguarda la visione e dall'altra parte protegge le cellule della pelle.

Il β carotene quando viene assunto viene rotto, le due parti del β carotene danno luogo a due molecole → il retinolo che tramite ossidazione viene trasformato in cis-retinale cioè il pigmento della visione, può interagire con la luce si trasforma in trans-retinale e dà luogo al segnale neuronale al cervello, se questa molecola viene ulteriormente ossidata può essere trasformato in acido retinoico il quale invece dà luogo al segnale ormonale che scatena la formazione di melanina nelle cellule epiteliali.

La struttura delle membrane cellulari è chiamata struttura a mosaico fluido perché i fosfolipidi non sono in una struttura rigida ma hanno possibilità di muoversi e di riarrangiarsi, al suo interno alloggiano tutte quelle proteine di membrana che servono a fare interagire l'esterno con l'interno e quindi con il citoplasma, DNA e necessità cellulare.

I fosfolipidi formano un doppio strato in cui le regioni non polari dei lipidi sono all'interno dello strato mentre le parti polari sono all'esterno interagendo così con la fase acquosa da entrambi i lati. I due strati hanno caratteristiche specifiche, è diversa la composizione proteica dello strato esterno rispetto allo strato interno.

Le membrane cellulari sono quindi costituite da due strati fosfolipidi con le catene idrofobiche affacciate tra di loro e la parte idrofobica fa da barriera.

La membrana fa sì che il trasporto debba essere in qualche modo mediato.

Le proteine fanno da trasportatori, sono canali di ingresso di ioni, comunicano con l'esterno e quindi sono in grado di comunicare con le cellule circostanti, danno interazioni e legami tra cellule-cellule, mediano contenuto di calcio, le proteine di membrana hanno davvero un sacco di funzioni.

Si trovano all'interno della membrana in modo diverso, alcune sono completamente immerse ma non sono esposte sulla superficie, altre presenti solo in una metà della membrana e sono esposte o all'interno o all'esterno.

Le proteine sono macromolecole funzionali con un obiettivo e con una funzionalità ben specifica, anche le proteine di

membrana hanno lo stesso scopo.

C'è possibilità di movimento da parte dei fosfolipidi e da parte delle molecole in esso alloggiate di movimento laterale senza alcuna limitazione → le proteine possono spostarsi lateralmente ma non è possibile un movimento, a meno che non venga assistito da un'enzima e da una spesa energetica, di saltare da un lato all'altro della membrana quindi il movimento dall'esterno e all'interno deve essere mediato.

Le molecole che sono contenute nel doppio strato lipidico hanno questo movimento fluttuante.

Le proteine sono diverse a seconda se sono affacciate all'interno e all'esterno, la stessa cosa vale per i fosfolipidi.

Ci sono fosfolipidi di composizione diversa verso l'interno rispetto ai fosfolipidi proiettati verso l'esterno.

Proteine di membrana legate ai lipidi, la membrana ha bisogno di una grande complessità per esercire le funzioni di trasporto e comunicazioni con l'esterno.

La distribuzione e composizione è una costante per tutte le membrane per tutte le cellule.

In linea di principio questa struttura è tipica e comune e costante in tutti gli organismi, sia eucarioti superiori che i procarioti.

Il doppio strato lipidico può avere diverse strutture e stati che dipendono dalla T, esistono due strati limiti: uno è quello paracristallino, praticamente il gel, tutte le teste polari sono allineate e tutte le catene sono impacchettate tra di loro e danno luogo a una struttura molto regolare e l'altro è lo stato fluido in cui non c'è organizzazione e regolarità nell'assemblaggio, i gruppi fosfato sono tutti in disordine e la stessa cosa vale per le catene aciliche.

Esiste poi uno stato intermedio che è quello che regolarmente assume il doppio strato lipidico in cui siamo in presenza di un liquido ordinato, questo consente il movimento laterale e consente la diffusione di molecole in entrambe le direzioni, in-out e out-in.

I movimenti possibili di un fosfolipide sono di due tipi: il primo è il movimento laterale, non ha bisogno di apporto energetico e non ha bisogno di essere catalizzato, avviene abbastanza velocemente senza problemi; il secondo è il ribaltamento del fosfolipide che può passare dalla sup esterna a rivoltarsi verso la sup interna, questo movimento è molto lento perché il flip-flop è un'operazione molto complessa, la sua testa polare è costretta ad attraversare un mare apolare e ciò non è favorito né tantomeno semplice.

Movimento possibile ma avviene se catalizzato da un enzima chiamato flippasi, in presenza di lui il fosfolipide può ribaltare se stesso e trasferirsi su un gruppo polare dalla parte esterna alla parte interna.

Movimento accoppiato da un apporto energetico e quindi accoppiato dalla presenza di ATP e quindi rilascio e poi recupero di fosfato. Questo movimento è spesso associato ai trasportatori, il fosfolipide insieme alle proteine di membrana fa da transporter alle cellule che sono all'interno. Spesso il trasporto avviene contro un gradiente di concentrazione, carica elettrica o entrambi, in cui i soluti devono essere "pompati" in un processo che richiede energia.

Es. integrina in grado di associarsi ad altre proteine di membrana, ha un centro calcio che fa da mediatore, collagene si comporta in questo modo o la fibronectina e le molecole che favoriscono il riparare il tessuto epiteliale; caderine in grado di mediare l'apporto di calcio ma attraverso questi centri calcio fa parte della famiglia immunoglobuline e quindi è in grado di agire con le cellule vicinali; N-CAM con i suoi gruppi S-H fa parte degli anticorpi.

La membrana ha obiettivo separazione e protezione, deve essere permeabile, le cellule hanno bisogno di acquisire nutrimento dalla parte esterna per le reazioni di biosintesi.

A seconda della tipologia di molecola, di sostanza che deve attraversare la barriera, l'attraversamento può essere fatto in modi diversi: per esempio per composti piccoli e non polari si può avere trasporto passivo e solo per gradiente di concentrazione, in altri casi il trasporto deve essere mediato dalle proteine di membrana perché il trasportato deve essere trasportato contro il gradiente di concentrazione → problema per molecole non cariche e ancora maggiore per problema cariche (va forzato l'ingresso rispetto alla concentrazione della specie e nel caso di molecole cariche/ioni il problema è legato anche alla concentrazione di carica e quindi si deve andare contro il gradiente di concentrazione, implica un trasporto mediato che, non sempre, è attivo ma può essere un trasporto facilitato attraverso proteine che fanno da canali).

Ho carrier che sono in grado di legarsi alla molecola e trasportarla verso l'interno in alcuni casi senza l'intervento di enzimi. Nel caso di cellule procariote il problema è trasportare da out a in e da in a out, la cellula espelle lo scarto derivante dai processi biochimici, lo scambio dello scarto basta.

Nel caso delle cellule eucariote il caso si complica perché hanno una serie di funzioni fatte da organelli interni, i reattivi

devono essere trasportati all'interno degli organelli e poi deve essere espulsa la sostanza prodotta oppure le sostanze di scarto.

Il trasporto potrebbe essere modellato attraverso una membrana permeabile andando ad equilibrare la concentrazione nelle due parti separate della membrana e quindi utilizzando come forza motrice la differenza di concentrazione, nel caso delle molecole neutre, oppure non solo tenendo delle concentrazioni ma anche del potenziale elettrico, nel caso delle molecole cariche.

Le membrane cellulari non si limitano a gestire il trasporto attraverso questo tipo di modello perché sarebbe inefficiente perché spesso ciò che deve essere trasportato va contro il gradiente di concentrazione e quindi entrano in gioco quei fenomeni di trasporto mediato e assistito dei trasportatori.

Il trasporto quindi dipende dalla tipologia di molecola che deve essere trasportata.

È un meccanismo di protezione → il raggiungimento dell'equilibrio porterebbe a morte cellulare.

Cambiano in funzione delle necessità cellulari, in alcuni casi servirà per esempio maggior glucosio e quindi la cellula dovrà governare il trasporto del glucosio ad hoc.

Controllare ingressi e uscite per protezione.

A seconda della tipologia di molecola il controllo sarà esercitato in modo maggiore o minore, per esempio nel caso di glucosio il controllo è assistito ma non particolarmente controllato, opera per gradiente di concentrazione; diverso è il caso degli ioni che cambiano la forza ionica del citoplasma e le concentrazioni ioniche cellulari e che possono portare a forti modificazioni. Sono tra le specie maggiormente controllate durante il trasporto.

Ci sono comunque tante tipologie diverse: diffusione semplice con composti non polari per gradiente di conc, esiste poi una diffusione facilitata che avviene per gradiente di concentrazione elettrochimica, trasporto attivo primario (trasporto attivo è sempre mediato e catalizzato da un'enzima e richiede l'intervento di energia) in questo caso la specie interessata che deve essere trasportata è la specie interessata direttamente dal trasporto, esiste trasporto attivo secondario in cui dati i problemi legati ai gradienti delle concentrazioni e ai gradienti elettrochimici implica l'intervento di enzimi e allo stesso tempo deve essere espulsa un'altra specie (tipico della pompa sodio potassio), ci sono poi i canali che consentono di trasportare ioni, avviene attraverso interazione tra proteina e ione stesso e infine ci sono i trasporti in cui lo ione è mediato dallo ionoforo, una proteina che viene secreta nell'ambiente esterno che è in grado di interagire con lo ione e di rilasciarlo con espulsione di proteina all'esterno.

Il trasporto passivo e la diffusione per trasporto passivo dipendono da che cosa deve essere trasportato e dalla molecola che deve diffondere verso l'interno.

I trasporti assistiti hanno bisogno dei trasportatori, ci sono due categorie: *carriers*, molecola di solito proteina in grado di interagire con ciò che deve essere trasportato e di attraversare la membrana e quindi di favorire l'ingresso della specie trasportata oppure i *canali*, di solito consentono i movimenti trans-membrana come i flip-flop e consentono la diffusione delle molecole attraverso le modificazioni del doppio strato lipidico.

I carriers possono essere saturati mentre i canali, non avendo un sito di interazione, no.

I carriers si legano al loro substrato con un'alta stereospecificità mentre i canali mostrano una meno stereospecificità.

Es. glucosio: Il trasportatore esiste in due conformazioni: (T1) con il sito di legame del glucosio esposto sulla superficie esterna della membrana plasmatica e (T2) con il sito di legame esposto sulla superficie interna.

Il trasporto del glucosio avviene in quattro fasi. (1) Il glucosio nel plasma sanguigno si lega a un sito stereospecifico su T1 (2) questo abbassa l'energia di attivazione per un cambiamento conformazionale da T1 a T2 effettuando il passaggio transmembrana del glucosio (3) Il glucosio viene ora rilasciato da T2 nel citoplasma e (4) il trasportatore ritorna alla conformazione T1, pronto a trasportare un'altra molecola di glucosio.

Altro meccanismo di trasporto è quello attivo, il trasporto attivo può essere di due tipi: diretto, sulla specie che deve essere trasportata, indiretto in cui c'è il coinvolgimento di due specie diverse.

La reazione che avviene in entrambi i casi è di tipo endoergonico e quindi c'è bisogno di apporto energetico, può essere messo in atto solo se accoppiato con un processo esoergonico come l'assorbimento della luce, una redox oppure idrolisi di ATP a dare ADP e fosfato (secondo il principio dell'intermediario comune).

Nel caso del trasporto diretto la specie che deve essere trasportata implica la fosforilazione con formazione dell'intermediario e l'energia rilasciata dall'idrolisi dell'ATP guida il movimento del soluto contro un gradiente elettrochimico, nel caso del trasporto secondario l'operazione esoergonica viene effettuata su una specie diversa da quella che deve essere trasportata e questo fa sì che venga ad essere modificata la struttura del trasportatore che è in

grado di far entrare la specie che deve essere trasportata all'interno.

Es: pompa sodio – potassio, esempio di trasporto attivo che implica sostanzialmente l'intervento di due specie, in funzione delle necessità cellulari quel che accade è che 3 ioni sodio vengono alloggiati all'interno del trasportatore e viene ad essere fosforilato dall'ATP.

La fosforilazione implica una modificazione, l'alloggiamento dei 3 ioni porta a un cambiamento della conformazione che spinge la reazione di fosforilazione, questa reazione porta nuovamente a un cambiamento di conformazione tale per cui si apre un canale verso l'esterno. Il canale nella condizione iniziale è aperto verso l'interno e quindi non fa fosforilazione ma dopo la fosforilazione di una delle subunità dà luogo a una modificazione con apertura del canale verso l'esterno; il cambiamento di conformazione porta al rilascio degli ioni sodio verso l'esterno.

All'interno di questo canale possono essere alloggiati 2 ioni potassio, questi di nuovo modificano la conformazione interagendo con la struttura ma questo tipo di struttura, causa alta richiesta di livello energetico, rilascia un gruppo fosfato che nuovamente porta a un cambiamento di conformazione che implica un canale aperto verso l'interno e così gli ioni potassio vengono rilasciati.

Una volta fatto, il transporter torna nella sua conformazione iniziale e quindi può riprendere il ciclo.

L'ATP è necessario perché l'apertura del canale è di tipo endoergonico e quindi ha bisogno dell'apporto esoergonico della fosforilazione.

Il **microrganismo** deve crescere in un mezzo semplice, in modo rapido, i prodotti finali non devono essere tossici e non devono essere troppo complessi (per non avere costi di separazione eccessivi), deve poter essere facilmente modificabile geneticamente oppure il suo patrimonio genetico deve essere noto in modo da capirne la sua fisiologia, deve avere per esempio una forma tale per cui deve essere facilmente separabile dal resto del brodo, deve essere resistente a eventuali predatori, se può non deve avere richieste alte di ossigeno.

Tutte cose per massimizzare la produzione e per tamponare tutti i problemi legati ai processi biotecnologici.

Hanno una serie di meccanismi di difesa che mettono atto quando per esempio vogliamo sovra-produrre.

Se devo trovare un microrganismo per una produzione lo devo cercare nell'ambiente naturale, ma lui non mi sarà utile perché i suoi processi metabolici sono quelli tipici naturali e quindi sono lontani da quelli che vorremmo attuare nel reattore. Ciò che entra nei processi sono organismi geneticamente modificati, la manipolazione genetica viene fatta nel momento in cui si serve → viene fatto ciò che è necessario, non sempre una modificazione genetica è importante (in termini quantitativi), spesso si fa prima vivere l'organismo in modo naturale e poi lo si modifica.

La manipolazione genetica può essere suddivisa in due categorie: una che non implica l'uso di DNA estraneo oppure quelle che implicano l'uso di DNA estraneo (non necessariamente di specie molto diversi ma anche di specie simili, porta a una terza specie finale che contiene il patrimonio genetico di entrambi).

Gli organismi naturali non producono nulla che non sia strettamente necessario alla sopravvivenza, mettono in atto meccanismi regolatori e di controllo che molto spesso gli organismi sviluppati per la produzione biotecnologica non possono mettere in atto. Quello che si vuol fare è andare a disorganizzare e a distruggere i meccanismi regolatori in modo tale che poi possano portare alla sovrapproduzione del materiale desiderato.

L'organismo durante la fase di produzione sintetizza enzimi in grado di trasformare sostanze che si trovano naturalmente in ambiente, questi enzimi sono chiamati **inducibili** cioè non sono sempre presenti durante la crescita ma vengono ad essere prodotti in risposta alla composizione del substrato con cui il microrganismo si viene a trovare. Per esempio si mette all'interno del substrato una molecola, analoga al substrato stesso, tale per cui vengano ad essere prodotti gli enzimi inducibili in grado di degradare questa molecola, guido così la produzione verso un prodotto finale diverso. Altra possibilità di sovra-produrre è quello di andare a sregolare il meccanismo di feedback.

In generale si preferisce modificare il substrato che andare a modificare il patrimonio genetico per cambiare il meccanismo di feedback. La regolazione di feedback che si divide in inibizione del feedback e repressione del feedback può essere anche molto complicata.

Target: ottimizzare la produzione biotecnologica per i prodotti.

Si possono reindirizzare i metabolismi a prodotti specifici oppure posso andare a modificare la cascata biosintetica in modo tale che non si venga a verificare un prodotto indesiderato (prodotto di stoccaggio, escrezione e difesa).

Questi risultati vengono perseguiti dall'ingegneria genetica naturale che cerca o di forzare l'evoluzione o di generare delle mutazioni che si adattino alle condizioni di produzione.

Si cerca di mettere il microrganismo in una condizione di stress ambientale tale per cui si adatti, muti e crei un nuovo

organismo in grado di effettuare delle generazioni di biosintesi diverse.

L'obiettivo di entrambi i metodi è quello di accumulare un certo prodotto.

In entrambi i casi modifico il substrato ma la differenza è che in un caso è un modo di procedere durante la fase di produzione, modifico infatti il substrato in modo tale che la produzione venga fatta da un organismo abbastanza convenzionale e ogni volta uso un substrato tale per cui vengano a essere sregolati i processi biosintetici che portano alla glicolisi e al ciclo di Krebs es. accumulo acido citrico.

Altrimenti, applicando lo stesso principio della modificazione del substrato (non nel caso della produzione dell'acido citrico in quanto problema troppo complesso), seleziono un organismo naturale, forzo la sua crescita e lo sviluppo durante la fase di ricerca in substrati fortemente modificati che, per esempio, siano in grado di attivare gli enzimi inducibili; l'organismo naturale quindi è costretto a crescere e a svilupparsi in queste condizioni modificate, crescendo e moltiplicandosi ad un certo punto potrebbe dar luogo a un mutante che è in grado di crescere e sopravvivere SOLTANTO in quelle condizioni e quindi questo mutante sarà il mutante ottimale per quel tipo di produzione che parte da quel substrato particolare.

Le mutazioni avvengono nella fase logaritmica della fase di crescita dell'organismo dove ho il massimo di velocità.

Le mutazioni possono essere neutrali, benefici o dannose. I mutageni sono gli agenti che causano le mutazioni; si parla di mutazione spontanea quando si è in assenza di mutageni.

Sostanzialmente per indurre le mutazioni si possono usare metodi diversi: come avviene nella natura quindi o con bombardamento di raggi x e gamma (che causano la formazione di ioni che possono reagire con i nucleotidi e la struttura di desossiribosio-fosfato) e ultravioletti (che producono dimeri di timina tra residui adiacenti di timina), oppure con agenti mutageni.

Il nostro sistema è in grado di riparare gli errori perché è in grado di riconoscerli e di rimuoverli.

Il DNA è in grado di ripararsi, c'è un'enzima in grado di riconoscere se queste mutazioni avvengono e rimuovere il pezzo danneggiato, l'enzima idrolizza e rimuove la parte che non corrisponde più a quello che dovrebbe corrispondere e il DNA polimerasi è in grado di sintetizzare la parte del DNA da ripristinare, dopodiché il DNA ligasi chiude il gap e ripristina la situazione originaria. Una mutazione spontanea è 1 ogni 10^6 di geni replicati.

Esempio: produzione di fenilalanina per fermentazione.

È una fermentazione che parte da glucosio, viene fatto dell'inoculo attraverso i batteri, si genera la biomassa e viene prodotta la fenilalanina. È una sintesi a cascata enzimatica, alla fine in base alla via metabolica scelta dall'organismo posso avere 3 amminoacidi diversi: fenilalanina, tirosina e il triptofano.

L'organismo in funzione delle sue necessità sceglierà la via e in funzione della sintesi proteica che sta facendo.

Per portare alla fenilalanina dobbiamo inibire la via che porta alla tirosina, il triptofano non è un problema perché il microorganismo lo prende dalla natura direttamente. Si genera allora un mutante: l'*auxotrofo* che è un microorganismo mutante incapace di sintetizzare una sostanza richiesta per la sua crescita ma capace di crescere se la sostanza viene fornita; c'è anche il *prototrofo*, in grado di sintetizzare invece tutti gli enzimi.

Il prototrofo ha maggiori probabilità di sopravvivenza.

L'*auxotrofia* è dunque l'incapacità di un organismo di produrre un'enzima che catalizzi una reazione per la sintesi di un fattore di crescita essenziale.

Gli auxotrofi possono essere o non più in grado di ripristinare le vie perse oppure, se stimolati opportunamente, possono riaprire vie che avevano chiuso e quindi in grado di nuovo di sintetizzare le molecole necessarie.

Noi selezioniamo un microorganismo mutante, per esempio l'*Escherichia*, che sia auxotrofo per tirosina e triptofano in modo tale che tutta la reazione venga diretta verso la produzione di fenilalanina.

Un modo per generare un auxotrofo è andare a cercare in un ambiente naturale un prototrofo, lo prendiamo e lo coltiviamo su un mezzo di coltura minimale (soltanto il minimo che gli consente di crescere), ottengo una colonia e effettuerò un trattamento mutageno con qualcosa che so essere in grado di generare delle mutazioni, non sto orientando le mutazioni e statisticamente mi aspetto che alla fine venga generato un auxotrofo di mio interesse. A questo punto trasferisco le colonie in un mezzo ricco e completo e lo farò crescere, avrò così ottenuto colonie di prototrofi, auxotrofi di non mio interesse e auxotrofi di mio interesse.

Trasferisco nuovamente la colonia su un mezzo minimale con un antibiotico e dato che questo uccide solamente chi cresce ucciderà i prototrofi non toccando gli auxotrofi poiché questi non sono più in grado di crescere perché non hanno più possibilità di dare luogo a sintesi enzimatica che porta agli amminoacidi che poi costituiranno le loro

proteine e mi ritroverò quindi solo con le colonie di auxotrofi.
Dopo averle separate andrò a selezionare l'auxotrofo di mio interesse.

METABOLIC ENGINEERING: Eliminare un gene

Seguendo l'ingegneria metabolica ossia l'ingegneria fatta attraverso la modificazione del patrimonio genetico si può eliminare un gene per non ottenere il prodotto a cui avrebbe portato.

Endonucleasi di restrizione: enzimi in grado di tagliare le catene di DNA in un punto specifico per andare a eliminare parti che non si vogliono oppure per inserire, laddove è stato effettuato il taglio, una nuova informazione.

Inserzione di un'informazione di un patrimonio genetico: utilizzo un plasmide, un frammento di DNA circolare all'interno del quale viene inserita l'informazione desiderata.

Dobbiamo considerare: vettore che consentirà di portare l'informazione dove ci interessa e l'ospite che deve riuscire ad accettare l'informazione e a preservarsi.

Si utilizza un enzima di restrizione che va a tagliare il DNA laddove vogliamo inserire l'informazione e con gli stessi enzimi di restrizione inseriamo l'informazione e il plasmide verrà inserito all'interno della cellula che vogliamo modificare. Si possono andare a inserire informazioni che vanno a sintetizzare nuove proteine o nuovi amminoacidi, a interrompere meccanismi di feedback o a produrre molecole simili a quelle che l'organismo già produceva ma un pochino modificate. Questi approcci rendono possibile la sovrapproduzione di un'ampia varietà di prodotti.

Si va a rimuovere o ad inserire il patrimonio genetico in modo da ottenere dei cloni in cui all'interno viene alloggiata la nuova informazione. Bisogna selezionare il gene, studiarlo e isolarlo e i protagonisti sono l'ospite e il vettore.

Crossing over → due cromosomi si rompono e si ricompongono.

I vettori che normalmente si usano sono o dei plasmidi oppure dei batteriofagi, cioè virus che vengono utilizzati per infettare l'ospite con l'informazione che vogliamo trasferire.

Il vettore deve essere in grado di tenere su di sé l'informazione, deve essere facilmente accettato dall'ospite, deve contenere anche l'informazione di promozione del gene.

L'ospite deve avere un turnover rapido di crescita perché tanto più velocemente cresce e tanto più l'informazione sarà inglobata dalla popolazione, deve sopravvivere allo scambio di informazioni, in più se è in grado di sviluppare e crescere in un mezzo binario si risparmiano costi, deve essere possibilmente non patogeno, l'ospite deve essere ben delineato per capire se sarà in grado di fare questo scambio, non deve fare retromutazioni per preservare il patrimonio genetico nuovo, deve essere in grado di produrre grandi quantità del prodotto desiderato.

Ricombinazione: frammenti di DNA del donatore, ossia della cellula da cui li abbiamo estratti, vengono messi in contatto con una cellula cromosomiale e la cellula recipiente è in grado di accettare questi frammenti di DNA.

La cellula recipiente contiene al suo interno un plasmide.

Stiamo costruendo il vettore all'interno dell'ospite e il DNA cromosomiale è in grado di accettare durante la fase di replicazione un pezzetto dei frammenti che derivano dalla cellula donatore, il pezzetto viene inserito nel suo DNA cromosomiale e il DNA non ricombinato verrà eliminato generando così una cellula geneticamente modificata.

Questa operazione di trasferimento è fatta per esempio attraverso un'operazione di *coniugazione*: si parte da un battere che contiene il suo DNA cromosomiale, all'interno di questo batterio viene trasferito un plasmide che contiene un certo tipo di fattore che porta su di sé le informazioni.

Si opera in modo tale che due cellule possano interagire tra di loro in modo sessuato (ci sono una serie di tecniche che modificano le condizioni ambientali permettendo questa operazione), durante la fase di replicazione accade che il fattore F ossia il fattore che contiene al suo interno il plasmide con l'informazione da trasferire, viene duplicato e trasferito nell'altra cellula.

Nell'esempio le cellule che contengono le informazioni sono rappresentate come cellule F+ mentre le cellule F- sono quelle che non contengono il fattore; attraverso quest'operazione si formano due cellule F+ con patrimoni genetici differenti. Quindi all'interno della cellula viene spinta la ricombinazione e il fattore che abbiamo inserito con l'informazione viene integrato nel patrimonio genetico e cromosoma originario della cellula.

Queste cellule sono chiamate ad alta frequenza di ricombinazione, sono cellule in grado di far partire tutta la replicazione e tutto il meccanismo.

Riassumendo quindi abbiamo un donatore originario da cui viene isolato un gene, il gene è inserito all'interno del plasmide e gene + plasmide sono tagliati con lo stesso enzima di restrizione per ottenere la cellula ricombinante.

Le estremità complementari si legano infatti per formare un singolo plasmide ricombinante, questo viene introdotto

nella cellula ospite e all'interno della cellula dopo un certo tempo l'RNA riconosce il plasmide come portatore di informazione e il gene viene trascritto. Quindi per esempio la proteina che è codificata da questo gene è prodotta come se l'informazione provenisse dal patrimonio genetico originale.

Un'altra tecnica possibile è la *trasduzione*: si prende un fago che è un virus costituito da un capsido proteico in grado di attaccarsi sulla superficie della cellula, all'interno del capsido non si lascia l'informazione originaria del virus ma la si sostituisce con un filamento di DNA che porta la nuova informazione che si vuole portare nella nuova cellula.

Il virus portatore di nuove informazioni è in grado di infettare la cellula dell'ospite, si attacca sulla superficie e inietta il filamento contenente l'informazione da trasmettere, entra all'interno del batterio e rilascia il DNA.

Questo filamento di DNA segue un andamento simile a quello di un'infezione virale cioè non solo viene riprodotto il filamento ma viene prodotto anche il capsido → tende dunque a riprodurre se stesso contenente il DNA originario.

il fago quindi infetta il donatore cioè il microrganismo che porta l'informazione che vogliamo replicare, entra dentro e inizia a replicare se stesso quindi distrugge il DNA batterico e costruisce dei capsidi (perché rigenera sé stesso, mette al suo interno il patrimonio genetico) .

All'interno del donatore non c'è soltanto il DNA infettante ma anche il DNA del donatore stesso quindi durante la replicazione del fago occasionalmente alcuni pezzi di DNA batterico, ivi incluse le informazioni di interesse, vengono contenute dai capsidi, progressivamente il donatore si riempie di capsidi e si rompe rilasciando i vari capsidi contenenti le varie informazioni.

Si recuperano i capsidi con il DNA batterico che si vuole trasmettere all'ospite e si infetta l'ospite con il capsido contenente l'informazione e attraverso un'operazione di ricombinazione si include l'informazione genetica del capsido nel DNA batterico → abbiamo portato l'informazione dove volevamo.

Con la tecnologia del DNA ricombinante vengono prodotti: interferoni ossia peptidi usati per curare la sclerosi multipla, il cancro e infezioni virali come l'epatite; ormoni in grado di curare qualche forma di anemia, ormoni di crescita, ormai capaci di sciogliere il sangue; enzimi, che hanno funzioni particolari come essere usati in seguito a danni cerebrali; vaccini oppure proteina delle fibre di ragno usata come rinforzante dei materiali antiproiettile.

OGM: organismo geneticamente modificato.

Sono organismi prodotti attraverso la tecnologia del DNA ricombinante che contengono nel loro patrimonio genetico informazione che deriva da geni esterni. Sono OGM sia i microrganismi che contengono informazioni derivanti da altri DNA ma della stessa specie (es. batterio con batterio) quindi non transgenici che quelli transgenici che contengono quindi informazioni che derivano da un'altra specie.

Es. plasminogeno in grado di sciogliere i coaguli.

BIOSENSORE: dispositivo che contiene al suo interno qualcosa di biologico che è in grado di misurare in modo quantitativo e qualitativo un certo tipo di informazione; contiene anche qualcosa in grado di generare e trasmettere un segnale che sarà correlabile con la grandezza che stiamo misurando.

È un sensore che integra un elemento biologico e delle risposte di tipo fisico chimico per produrre un segnale che sia proporzionale a un'analisi specifica. Il biosensore è trasversale: genera un segnale proporzionale per esempio alla concentrazione di una molecola, è un misuratore specifico.

Deve: avere una risposta generale, essere sensibile al valore della concentrazione, essere selettivo e il tempo di risposta deve essere rapido. I biosensori devono essere piccoli.

Biosensore = biorecettore, molecole biologiche in grado di riconoscere un bersaglio specifico + trasduttore, apparecchiatura in grado di convertire il riconoscimento in un segnale misurabile.

Il bio-componente è normalmente depositato su una membrana o su uno strato di gel e il bio-componente deve essere in stretto contatto con il trasduttore per trasmettere il segnale.

Ci deve essere un porta bio-componente, ossia qualcosa in grado di alloggiare il bio-componente, quest'ultimo può essere un enzima o microrganismo, ci deve essere una parte di misura (come misuratore di pH, elettrodi ecc); una volta generato il segnale questo viene trasformato in un segnale elettrico e poi viene mandato al detector.

Esempio: misuratore di glucosio, la componente biologica è l'enzima glucosio ossidasi in grado di interagire con il glucosio e trasformarlo in acido gluconico con consumo di ossigeno; il sistema è costituito dall'alloggiamento del glucosio ossidasi e dall'ossigeno. Se non è presente il glucosio il misuratore del sensore legge l'ossigeno, è sostanzialmente un elettrodo in grado di leggere ossigeno. Nel momento in cui il sistema viene a contatto con il glucosio, avviene la reazione ad opera dell'enzima con consumo di ossigeno e il sensore legge questo calo.

La quantità ridotta di ossigeno è proporzionale al glucosio formato.

Vari applicazioni: test di gravidanza, analisi del glucosio per chi ha il diabete, analisi di infezione, analisi di cibo, controllo qualità ecc. Esistono molti detector dell'ossigeno.

Operando attraverso un'enzima esso legge solo il substrato che gli compete.

PROCESSI Prof. Bellotto

Crescita della curva in un sistema batch: fase di adattamento, fase esponenziale, fase di declino della velocità di crescita e fase di mantenimento dove il nutrimento diventa il fattore limitante e una fase di morte per mancanza di nutrimento e/o presenza di veleni all'interno del reattore causate dalle reazioni biochimiche all'interno del reattore. La fase di adattamento è la fase in cui le cellule si adattano all'ambiente di partenza, per un certo periodo di induzione non si ha replicazione cellulare.

Nella fase di crescita esponenziale la crescita non è limitata da condizioni esterne, siamo in condizioni di eccesso di substrato per cui la velocità di crescita dipende soltanto dalle caratteristiche genetiche delle cellule.

Vi è una cinetica di primo ordine in cui numero delle cellule raddoppia ad intervallo di tempo costante.

Nella fase di declino il substrato inizia a diventare limitante.

Nella fase stazionaria, il substrato è scarso ed è sufficiente solo per mantenere in vita le cellule senza crescita e infine nella fase di morte il substrato è insufficiente e le cellule sono distrutte dalla lisi.

La fase di induzione è una fase che mostra una mancanza di crescita e moltiplicazione cellulare, la durata di questa fase rappresenta il tempo di cui il microorganismo ha la necessità per adattarsi all'ambiente.

La lunghezza di questa fase dipende anche dalla quantità di cellule che abbiamo inoculato nel reattore.

E' una fase di acclimatazione, questo shock può essere dovuto alla alta concentrazione di nutrienti; alcune sostanze fanno da stimolanti della crescita e riducono il tempo di induzione (ad esempio alcuni metalli in tracce).

La fase esponenziale è una fase in condizioni non limitate dal nutriente.

Definiamo un tempo t_D ossia il tempo per raddoppiare la quantità di organismi nel reattore.

La velocità specifica (μ) di crescita è inversamente proporzionale al t_D , è la velocità di cambiamento della cellula per unità di concentrazione; è l'equivalente di una velocità di reazione in chimica industriale.

Alla fase esponenziale segue una fase in cui la crescita è limitata dal substrato. La fase di decelerazione inizia quando i nutrienti essenziali sono esauriti o quando i prodotti tossici iniziano ad accumularsi.

La limitazione del substrato può essere rappresentata o con dei modelli puramente **empirici** come il modello logistico in cui definiamo una K capacità di trasporto, la max conc di cellule che l'ambiente può sopportare (introduciamo un fattore limitante nella eq), abbiamo una curva a sigmoide simmetrica. E' un'eq puramente empirica, non è utilissima perché il fattore K che descrive la limitazione alla crescita non ha una giustificazione teorica e per essere misurata sperimentalmente dobbiamo misurarla in condizioni in cui la crescita è limitata e dunque non nelle condizioni ottimali.

Un modello analogo è quello di Gompertz, rappresenta l'andamento della fase in cui abbiamo la limitazione alla crescita meglio, è ancora una sigmoide ma è asimmetrica e la fase di rallentamento è più lenta della fase di inizio crescita della moltiplicazione cellulare; $x(t) = a \exp[-b \exp(-ct)]$; a è il valore asintotico e c'è la velocità di crescita.

Il modello che più frequentemente è usato è l'equazione di Monod che da la velocità specifica di crescita in funzione del substrato (S). Raggiunge il massimo μ_{max} e se il substrato diminuisce la velocità diminuisce.

È semi-empirica perché non è detto che la diminuzione della velocità sia effettivamente dovuta alla mancanza di concentrazione, se questo è il caso allora l'equazione può essere considerata deterministica.

In ogni caso possiamo rappresentare la velocità di reazione all'interno del reattore batch, la velocità specifica μ aumenta all'aumentare di S e tende ad un limite μ_{max} per concentrazioni infinite.

Quindi μ_{max} è la massima velocità di crescita specifica, K_s invece è chiamata costante di semi saturazione (perché numericamente K_s corrisponde alla conc di substrato per la quale la velocità di reazione è la metà di quella massima) o di affinità (dal punto di vista meccanicistico rappresenta la facilità con cui il nutriente attraversa la membrana cellulare, è una funzione dell'affinità del nutriente per il microorganismo in fase di crescita).

I μ_{max} hanno valori in un range ristretto mentre i K_s variano anche di ordini di grandezza.

Può darsi che ci siano casi in cui la velocità di crescita sia limitata da due substrati nello stesso tempo (quindi abbiamo S1, S2 ciascuno con la sua costante di affinità specifica).

L'equazione di Monod descrive una reazione lineare tra la velocità di crescita di biomassa e la velocità di consumo del substrato, abbiamo dunque due eq differenziali che ci danno l'andamento di cellule nel reattore e l'andamento del substrato nel reattore).

Il μ_{max} è una funzione del tipo di microrganismo in fase di crescita e della T.

Dai processi biologici possiamo avere prodotti nei settori della chimica, farmaceutica, energia, cibo e agricoltura.

Process development:

Identifichiamo il prodotto → scegliamo/costruiamo un microrganismo in grado di produrlo → una volta fatto da una parte produciamo del materiale a scopo di ricerca per determinare caratteristiche e laddove sia necessario avere le approvazioni dall'altra parte bisogna pensare al tipo di impianto per ottimizzare il processo.

La scala di tempo è tra i 5-15 anni.

Con le tecnologie di DNA ricombinante è possibile praticamente scegliere qualsiasi organismo per determinate produzioni (es Escherichia coli che produce etanolo con alte rese).

Modello dei bioreattori:

- 1) Continui (CSTR) in cui il reagente è alimentato continuamente al reattore e il prodotto viene prelevato alla stessa portata con la quale introduciamo i reagenti.
- 2) Batch, tutti i reagenti sono introdotti all'interno del reattore (a parte O_2 nei processi aerobici) prima che la reazione inizi.
- 3) Semi-Batch, possono essere continui in cui l'alimentazione del reagente è continua oppure può essere intermittente, quindi carichiamo il reattore lo facciamo andare a batch per un certo periodo dopodiché lo scarichiamo parzialmente, lo carichiamo a carica nuova e così via.
- 4) Semi-continui in cui i reagenti sono reintrodotti e scaricati a tempi fissati. Dopo un periodo iniziale in modalità batch, il reattore viene parzialmente scaricato. Quindi vengono introdotti nuovi reagenti fino al volume di reazione e la reazione continua in modalità batch fino allo scarico successivo.

FERMENTAZIONE NEI CSTR

Nei processi continui abbiamo l'alimentazione del substrato limitante a portata costante F e a concentrazione S_0 e alimentiamo il brodo di coltura, eventualmente questo è aerato e lo si tiene sotto agitazione.

Vi è poi il prelievo del brodo di reazione ancora a portata costante e la conc di biomassa X è più alta a causa della reazione avvenuta nel reattore e la conc di substrato è rispettivamente più bassa.

Le ipotesi sono che il reattore funzioni in cond stazionarie, che l'alimentazione è perlopiù sterile cioè il sistema è inoculato ma non abbiamo biomassa nell'alimentazione e che il substrato è limitante.

Dal bilancio di massa nel reattore, in cond staz, abbiamo una reazione che correla la portata di alimentazione con la velocità specifica di crescita del microrganismo. D è il fattore di diluizione, il reciproco del tempo di ritenzione e rappresenta il numero di riempimento del reattore nell'unità di tempo.

$Y_{x/s}$ è il coefficiente di resa della biomassa, quindi in funzione del consumo della biomassa si calcola la resa del microrganismo.

La produzione del microrganismo ha un massimo per una determinata portata, il massimo è molto prossimo ad una rapida diminuzione della resa. Questa zona è il regime chiamato "**wash out**", in questa condizione la portata è così alta che il tempo di residenza nel reattore è troppo piccolo affinché gli organismi abbiano il tempo di crescere (se infatti aumento F aumento velocità) e quindi produttività del reattore decresce.

Se il reattore è condotto a F prossima al max è sufficiente una piccola perturbazione perché la velocità di reazione scenda al di sotto del valore necessario per mantenere elevata la conc degli organismi nel reattore.

In queste condizioni la crescita degli organismi tende a 0, è come se fossero lavati via perché la velocità di uscita è maggiore della velocità di crescita data dalla reazione. In condizioni di wash out non si produce biomassa e la concentrazione del substrato nell'alimentazione e in uscita dal CSTR sono uguali.

Abbiamo dunque un D_{max} al di sopra del quale siamo in condizioni di wash out.

CHEMOSTATO: reattore in cui abbiamo portata costante e un prelievo costante e controlliamo i parametri della reazione (portata, pH, conc O_2 e CO_2 all'interno del reattore, T, P). In questo modo conduciamo un reattore CSTR controllando la conc microbica, assicurandoci di essere nelle cond ottimali per la crescita degli organismi.

In alcuni casi è possibile modificare gli schemi introducendo un concentratore che separa i microrganismi e li reintroduce all'interno del reattore, questo ci tutela dall'essere in condizioni di wash out perché ricicliamo gli organismi. La velocità dunque dipende anche dal fattore di riciclo.

Possiamo anche immaginare una serie di chemostati in serie nel quale il prodotto del primo stadio è utilizzato come inoculo di quello successivo, è uno schema utile se vengono utilizzati dei metaboliti secondari come alimentazione di un altro organismo.

Le concentrazioni e le portate possono essere diverse per ciascun reattore in funzione delle loro velocità di reazione.

BIOSTATI: reattori nei quali non facciamo affidamento ad un controllo cinetico delle reazioni che avvengono nel reattore per sapere qual è la produttività del reattore, misuriamo direttamente la conc dell'organismo nel reattore. Abbiamo la necessità di avere un sistema affidabile per la misura della concentrazione degli organismi nel reattore. Principio: densità ottica, ampio range lineare, qualche interferenza.

Possiamo introdurre delle etichette fosforescenti sugli organismi e misurare la fosforescenza, alta sensibilità e molte interferenze (es cambiamento del pH).

Possiamo avere delle misure di capacità, grande campo lineare però interferenza causate dalle bolle d'aria per aerazione e agitazione.

Sistemi ultrasonici, misurano l'attività cellulare e ci danno indicazione delle caratteristiche della sospensione e di come l'organismo lo modifica, interpretazione difficile, interferenza delle bolle d'aria dovute ad aerazione e agitazione.

FERMENTAZIONE NEI BATCH

Vantaggi: è meno facile la contaminazione perché carichiamo reagenti inoculati al reattore poi lo chiudiamo ed alimentiamo solo aria. Non abbiamo il problema di sterilizzare corrente di alimentazione.

Abbiamo maggiore flessibilità perché un singolo reattore può essere usato per reazioni diverse, migliore controllo della stabilità genetica perché ogni volta introduciamo organismi nuovi e non abbiamo rischio di alterazione nel corso della reazione stessa.

Nel caso per esempio della produzione farmaceutica si può avere un controllo indipendente delle materie prime per ogni singolo batch e questo può rappresentare un vantaggio per i sistemi altamente controllati in cui sia il processo che le apparecchiature devono essere approvate.

Svantaggi: si arriva rapidamente in condizioni di limitazioni e scarsità di substrato, è necessario dedicare il tempo per riempire, svuotare e pulire i reattori e risterilizzare ogni volta.

È più difficile controllare e progettare delle reazioni che non avvengono in condizioni stazionarie, bisogna avere un controllo all'interno del reattore. Possono esserci delle differenze tra i vari batch.

AERAZIONE

L'ossigeno è un reagente all'interno del reattore, esattamente come il substrato, per cui l'eq di Monod vale anche per l'O₂. Abbiamo dunque una velocità di reazione che è funzione della conc di ossigeno disciolto, nel caso in cui questo sia il fattore limitante.

Il QO₂ è il consumo specifico di ossigeno nell'unità di tempo e di volume.

Normalmente NON si opera in condizioni in cui l'ossigeno è il fattore limitante.

Il motivo per il quale vengono condotte reazioni aerobiche è che le cellule possono ottenere energia sia attraverso una respirazione aerobia che anaerobia tuttavia nei processi aerobi l'ossidazione del glucosio produce una quantità di ATP che è circa 20 volte superiore a quella prodotta da quella anaerobia → la vitalità delle cellule diminuisce in condizioni anaerobiche, abbiamo quindi una diminuzione della crescita in condizioni di anossia.

Normalmente nei reattori una variazione di ossigeno tra il 5% e il 35% non influenza in maniera significativa la crescita e la vitalità delle cellule; solitamente nella fase gassosa si conduce la cultura delle cellule con il 20% di ossigeno.

Se operiamo il reattore in condizioni anossiche (<5%) questo non ci garantisce la crescita degli organismi che anzi muoiono. La conc critica dell'ossigeno è dipendente dalle condizioni di fermentazione.

La concentrazione di O₂ disciolto dipende da una serie di processi che avvengono per trasportare ossigeno da fase gassosa a quello liquido:

- 1) trasferimento dalla fase gas allo strato limite
- 2) trasferimento all'interfaccia
- 3) trasferimento nello strato limite del liquido, ci dà la resistenza maggiore (resistenza sul film fluido), rate limiting step
- 4) diffusione nella fase liquida
- 5) trasferimento sullo strato cellulare e così entra nella cellula

La velocità di trasferimento è data da un'eq di trasporto: N_A , massa trasferita per unità di volume nell'unità di tempo, moltiplicata per area dell'interfaccia per forza motrice del trasferimento che è la differenza di conc tra fase gas C^* e fase liq C_L . C^* legata alla legge di Henry.

La velocità di trasferimento dipende anche da K_L che al suo aumentare fa aumentare la velocità, K_L aumenta al diminuire dello spessore dello strato limite del liquido. $N_A = K_L a (C^* - C_L)$

Per aumentare N_A si può pensare di aumentare la differenza tra le due conc, C_L è legata ad un valore critico che esiste per ciascun organismo e che più o meno ha sempre lo stesso ordine di grandezza (se vado sotto opero in condizioni anossiche), se vogliamo aumentare C^* pensiamo di aumentare la P ma essendo gli organismi sensibili alla P non si può fare. Dobbiamo dunque consumare poco ossigeno rispetto alla massa che introduciamo → operare in grande eccesso di aria per avere una grande quantità di ossigeno all'uscita.

Per determinare la velocità di trasferimento dobbiamo misurare la conc di O_2 in ingresso e in uscita al reattore in cond stazionarie, in principio questo è il modo migliore ma necessita di avere controllori opportuni e molto accurati.

In via alternativa si può misurare la conc attraverso delle titolazioni, ad esempio attraverso il **metodo del Solfito**; questo si realizza attraverso la rapida ossidazione del solfito in presenza di catalizzatori metallici, reazione molto veloce quindi si assume che la conc del solfito consumato corrisponda alla conc dell'ossigeno trasferito.

Se l'eccesso del solfito poi è titolato con un metodo iodometrico (aggiungo eccesso di iodio) esso viene retrotitolato.

Misurazione controllata ma non può essere fatta in presenza di una biomassa in crescita; non ci dà dunque indicazioni sulla fermentazione perché è un calcolo fatto in assenza della reazione che a noi interessa.

Altrimenti abbiamo il **dynamic "gassing out" method** che ci permette di determinare il coefficiente di scambio operando in un regime transitorio.

Abbiamo conc di O_2 disciolto, interrompiamo il flusso di aria e la conc di O_2 disciolto diminuisce, misuriamo la variazione in questo transitorio dopodiché rialimentiamo l'ossigeno ripartendo con la reazione e conc di O_2 aumenta e rimisuriamo la variazione. Otteniamo un eq di bilancio in cui q_x è dato dalla pendenza di una curva e da cui riusciamo a misurare il coefficiente di scambio.

Questo dipende da una serie di parametri del processo: T , attraverso una legge di tipo Arrhenius, dalla natura e dalla progettazione del sistema di alimentazione del gas quindi dalla portata, diametro e volume del reattore e dalla potenza dell'agitazione.

Altri fattori che influenzano K_L sono il tipo di microrganismo che determina le caratteristiche reologiche del nostro sistema (può essere basso per microrganismi filamentosi); densità, viscosità (al suo aumentare diminuisce K_L); composizione della fase liquida; forza ionica (elettroliti in soluzione rendono sistema di bolle più resistente alla coalescenza quindi aumenta K_L); dalla natura e dalla conc di tensioattivi e eventuale presenza di additivi antischiama. Gli elettroliti inibiscono la coalescenza delle bolle e gli agenti antischiama che invece aumentano coalescenza hanno una grande influenza sulla sup di scambio.

Nelle soluzioni saline abbiamo un K_L maggiore di un ordine di grandezza rispetto ad acqua pura.

L'aumento del coeff di scambio favorisce l'uso di reattori con piccolo diametro e grande altezza.

In condizioni aerobiche la quantità di aria da essere fornita è molto elevata, quella usata è 0.3-0.4 kg O_2 /kg substrato.

In cond batch il problema è operare proprio a alte conc di O_2 , l'aria deve essere continuamente alimentata e filtrata per essere sterilizzata. Le fermentazioni batch quindi sono di fatto semi-batch dal punto di vista dell'aria.

BIOREATTORI

Processo: materie prime + biocatalizzatore in un reattore → reazione → downstream process (operazione di separazione come filtrazione, cristallizzazione oppure operazione di purificazione come cromatografia e assorbimento) per recuperare ciò che serve → prodotto

I processi biotecnologici si differenziano per il tipo di fermentazione, design del processo e tipo di reattore il quale è scelto per ottimizzare le prestazioni.

La funzione principale del reattore è quella di fornire le condizioni ottimali per la crescita e per la formazione del prodotto nel particolare sistema di microrganismi che si sta impiegando.

La prestazione del bioreattore dipende da molti fattori come la concentrazione di biomassa, tutte le condizioni devono essere sterili, condizioni di agitazioni efficaci per garantire un rapporto di O_2 adeguato ma non devono essere eccessive

per danneggiare i microrganismi in crescita, il nutriente deve essere alimentato in modo opportuno (non in eccesso perché altrimenti rischiamo il wash out), rimozione del prodotto, dare una sufficiente aerazione, il reattore poi deve essere configurato in modo tale da monitorare le attività degli organismi e bisogna evitare l'inibizione dei prodotti.

L'ottimizzazione del processo di fermentazione significa progettare l'unità del fermentatore e dei suoi controllori. La configurazione del processo dipende dal tipo di organismo: cellule animali/vegetali, massa microbica o enzimi solubili/immobilizzati, dal tipo di reattore: batch, continuo, semi-batch, plug-flow; dai fattori economici: valore del prodotto, parametri del processo.

All'interno di un reattore è possibile controllare diversi parametri come pH, T, conc di O₂, quantità di calore scambiato attraverso tutto il processo. Vi è un processo di scale up, si passa da scale in condizioni di laboratorio passando per scala pilota per arrivare a scala industriale.

Un fermentatore può operare anaerobio o aerobio, con quest'ultimo utilizziamo i CSTR, reattori air-lift oppure sistemi immobilizzati.

TIPI DI FERMENTATORI

BATCH: tutti i nutrienti sono caricati all'inizio del processo, la velocità di crescita degli organismi può decrescere fino a 0 a causa dell'esaurimento del substrato oppure della concentrazione di tossine.

Una modifica del processo batch è il fed-batch semicontinuo nella quale la diminuzione dei nutrienti è compensata da successive aggiunte. È un sistema chiuso in cui non ho flussi continui.

CONTINUI: gli organismi e i loro nutrienti sono caricati continuamente nel reattore.

Lo scopo dei fermentatori è quello di ottimizzare la crescita degli organismi e la resa del prodotto.

I fermentatori sono delle unità semplici, possono diventare complesse quando sono integrate con dei sistemi di controllo. Possiamo distinguere due tipi di fermentatori: non asettici, in cui possiamo usare colture cellulari NON pure, oppure asettici in cui bisogna controllare la purezza dei prodotti (come produzione di antibiotici o amminoacidi).

Un altro modo di organizzare i reattori è in base a come è organizzata la fase biologica; gli organismi possono essere sospesi in brodo di coltura; cellule individuali; fiocchi e aggregati oppure la fase biologica può essere supportata e immobilizzata.

Abbiamo i reattori a percolamento tipici per la produzione dell'aceto oppure i trattamenti a letto fluidizzato utilizzati per le acque reflue.

Un fermentatore deve evitare l'ingresso di microrganismi, mantenere la selettività richiesta, mantenere un volume di brodo di coltura costante, mantenere conc di ossigeno disciolto più alta della conc critica, deve controllare i parametri come T e pH e deve permettere una buona omogeneità del sistema in crescita.

I materiali in contatto con le soluzioni devono resistere alla corrosione, non essere tossici (in questo modo non diventeranno inibitori della crescita) e devono sopportare cicli di sterilizzazione ad alte P. Inoltre, l'ispezione visiva del mezzo di crescita è vantaggiosa per cui se è possibile è preferibile usare materiali trasparenti.

Processo aerobio → processo trifasico: fase non acquosa come reagenti e prodotti (gas, liquidi e solidi), fase acquosa nella quale sono sciolti i reagenti e i prodotti e una fase solida che sono i microrganismi e parte delle cellule.

Alta produttività data dal mantenimento delle condizioni ottimali (parametri fisici come T e P e parametri chimici come il pH) richieste per la crescita della biomassa e quindi per una buona resa del prodotto.

Il bioreattore deve poter mantenere alti livelli di biomassa, assicurare sterilità, deve essere efficace per omogeneizzare, permettere uno scambio di calore adeguato e permettere un facile campionamento.

La scelta del reattore è fatta sulla base del microrganismo impiegato (se sono cellule animali o vegetali, se sono enzimi solubili o immobilizzati), della configurazione del processo (tipo di reattore) e del grado economico.

Il reattore deve permettere il passaggio sia dell'ossigeno che del nutriente fino all'organismo della cellula in crescita, bisogna favorire il contatto tra gli organismi e l'ossigeno e il nutriente. Quasi tutte le fermentazioni sono aerobiche.

Il parametro critico per un reattore aerobico è quello di avere un trasporto di ossigeno sufficiente.

L'ossigeno è il substrato più importante metabolico e la CO₂ è il prodotto metabolico più importante.

Scopo: massimizzare trasporto ossigeno limitato dalla solubilità dell'ossigeno e dalle barriere diffusive del film liquido che circonda le bolle di gas.

In assenza di carica microbica la velocità dell'ossigeno (OTR) può essere stimata con il metodo dei solfiti. Il sodio solfito è un agente riducente che reagisce con l'O₂ disciolto in presenza di cat metallico a dare solfato di sodio. Misurando la velocità di ossidazione del solfito misuriamo la velocità di trasporto dell'O₂. Il coefficiente di trasporto di massa dell'O₂ può essere calcolato mediante la velocità di trasporto dell'ossigeno e della sua solubilità. Necessario avere dei sensori che misurino l'ossigeno disciolto.

TIPI DI BIOREATTORE

I bioreattori appartengono a 3 famiglie: non agitati e non aerati (birra, vino), non agitati e aerati (SCP) e agitati e aerati (antibiotici).

I fermentatori possono essere divisi in 4 grandi gruppi:

BATCH: Parto da una conc di substrato, questo si consuma e quindi la sua conc si riduce.

CSTF (continuous stirred tank fermenters): conc costante, il sistema di alimentazione del substrato e di uscita del prodotto sono diversi da quelli del batch.

TF (tubular fermenters): reattori continui non agitati, in assenza di agitazione si osserva una diminuzione della conc di substrato dall'in all'out e in parallelo abbiamo aumento della conc di prodotto

Sistemi a letto fluido: simili ai TF, sono intermedi tra reattori agitati e reattori tubolari. Sono utilizzati per la produzione di birra e aceto. Microrganismi fluidizzati dalla corrente entrante in maniera sufficiente per vincere le forze gravitazionali e non avere la loro fuoriuscita insieme al prodotto.

I substrati solidi sono molto adatti per i batteri, tra quelli più usati troviamo legumi, cereali, paglia e segatura.

Il solido periodicamente viene rivoltato per permettere la diffusione dell'ossigeno e per smaltire la T.

Sono a basso costo, richiedono bassa energia, hanno una semplice tecnologia, hanno una bassa conc di acqua reflua; hanno lo svantaggio di avere una crescita cellulare più lenta, problemi di smaltimento di calore e di contaminazione batterica. Sono dei sistemi difficili da scalare (le dimensioni S/V dipendono dal reattore), difficile anche controllare l'umidità all'interno del substrato.

La fermentazione con questo tipo di substrato è spesso aerobia. La velocità di trasferimento dell'O₂ dipende dalle dimensioni delle particelle, la loro porosità e dal grado di vuoto all'interno del reattore.

Un eccesso di acqua e un annegamento del substrato hanno un effetto negativo perché occludono porosità e influenzano negativamente la velocità.

Un reattore usato è quello a *cilindro rotante*, V di circa 100 l, sono appoggiati su due rulli che li supportano e permettono la reazione. Utilizzati nella produzione di enzimi e masse microbiche.

Il riempimento (30% della capacità totale) deve essere tenuto basso per permettere buone capacità di trasferimento di O₂ e un buon smaltimento di calore. La miscelazione è scarsa.

Altrimenti si usano *reattori a letto*, il letto può essere alto fino a 1 m e deve essere poroso in modo tale da essere attraversato da aria umida che viene sempre influssata dal basso.

Ci sono anche i *fermentatori a vassoi* utilizzati per la produzione di enzimi, per migliorare il contatto il substrato è posizionato su dei vassoi in una camera dove viene influssata l'aria e fatta circolare. Reattore utilizzato nel 1 step di acido citrico. Possono avere V molto alti (fino a 150 m³).

Per i substrati liquidi l'areazione non è forzata, è legata all'OTR che dipende dalla velocità di agitazione, V del liquido e forma dei reattori. Per reattori da laboratorio (piccola scala) si intendono anche semplicemente delle beute.

Per aumentare il trasporto dell'O₂ si può aumentare la superficie d'interfaccia e quindi aumentare il V del reattore.

Se diamo un'agitazione alle beute miglioriamo il trasferimento dell'ossigeno a causa dell'agitazione che rompe il film superficiale e quindi aumentiamo la sup di scambio. Reattori con bassa velocità di trasferimento.

Molto spesso vengono messi dei setti per rompere il film del liquido e per aumentare l'agitazione.

Per sistemi a substrato liquido ad alto volume si passa a bioreattori con agitazione meccanica.

Il sistema di agitazione è costituito dai frangiflutti e dalle eliche attaccate sull'albero del reattore.

I primi servono ad aumentare la turbolenza e evitare vortici (e quindi mix di schiume) all'interno del reattore.

I reattori più utilizzati per processi asettici sono i **STR** che permettono una buona agitazione ma costano molta causa dell'agitazione, energia e sterilizzazione. È il reattore più comune per i processi asettici ed è anche il più omogeneo e versatile. Punti fondamentali del reattore: agitatore, frangiflutti e il sistema di distribuzione dell'aria (sparger) nei processi aerobici.

Bioreattore usato per $V > 200$ ml (al di sotto sono nelle condizioni da laboratorio).

I sistemi senza sparger danno una aerazione sufficiente per V fino a 3 l. Agitazione fino a 600 rpm per avere una buona diffusione dell'ossigeno. I reattori con lo sparger possono essere grandi (V fino a 500 l).

L'agitazione deve creare turbolenza per rompere bolle e favorire trasporto O_2 .

Ci sono due tipi di agitazioni: le eliche che danno un flusso assiale, danno una bassa turbolenza (utilizzati con microrganismi sensibili allo stress meccanico come cellule animali) oppure ci sono le turbine che danno una maggior turbolenza e si ha un buon trasferimento di O_2 , ciascuna turbina ha dalle 2 alle 6 pale.

La più utilizzata è la turbina Rushton, costituita da pale poste in modo perpendicolare al disco, il flusso è radiale.

Una modificazione delle turbina è un Airfoil in cui le pale sono inclinate e si ha un flusso un po' radiale e un po' assiale.

Il tipo di elica e di agitazione va a determinare il coefficiente di dimensionamento del K_L .

REATTORI AGITATI

Le caratteristiche reologiche del fluido possono essere newtoniane (viscosità costante per qualsiasi agitazione), non newtoniane (viscosità in funzione della velocità di agitazione, nei pseudoplastici la viscosità diminuisce all'aumentare della velocità di taglio mentre nei fluidi dilatanti la viscosità aumenta) oppure viscoelastici (al di sopra dello sforzo limite il materiale può essere fatto scorrere).

La maggior parte dei batteri dà comportamento newtoniano mentre i funghi caratterizzati da ife e materiali polimerici hanno comportamento non newtoniano. La viscosità del mezzo di crescita influenza l'efficienza dell'agitazione.

E' necessario ottimizzare la forma, dimensione e il numero degli agitatori.

Lo sforzo di taglio che viene esercitato dal sistema di agitazione determina le dimensioni delle bolle.

Gli elementi di agitazione possono impartire un flusso assiale o radiale (eliche flusso assiale, turbine flusso radiale).

La miscelazione della massa del reagente è meno efficace con le turbine rispetto alle eliche, le turbine però assorbono più energia. Il flusso radiale genera maggior turbolenza, serve di più a frammentare le bolle e a garantire un miglior coefficiente di trasporto.

La turbina Rushton è costituita da 4-6 pale intorno al disco centrale, è la turbina più comune, il suo diametro è un $1/3$ del diametro del reattore.

Le eliche sono più efficaci per ottenere una mix omogenea e per mantenere in sospensione i solidi e i microrganismi, danno una velocità di scorrimento (shear) più bassa, creano meno vortici e sono meno efficienti a rompere le bolle.

Shear più alto quando abbiamo profili di ingresso più affilati delle pale e meno efficaci a distribuire aria.

2 esigenze presenti ma contraddittorie: avere omogeneità della massa reagente e una buona dispersione di O_2 .

Possiamo allora usare 2 sistemi di agitazioni diversi per esempio turbina in basso e elica in alto.

Il motore può essere posizionato in alto o in basso, metterlo in alto è più costoso perché è necessario supportare l'albero per evitare rottura, normalmente la velocità di rotazione è mantenuta non più del 75% della velocità critica di instabilità dell'asse per evitare fenomeni di vibrazione che possano portare alla rottura dell'albero → per dare maggiore stabilità è necessario prevedere dei supporti all'albero di rotazione.

Posizionare il motore in basso invece è più semplice però richiede più manutenzione per le tenute, bisogna evitare le infiltrazioni del mezzo di reagente nelle tenute che possono poi danneggiarle a lungo termine e che possono causare delle perdite nel sistema di tenute.

I frangiflutti aumentano l'omogeneità del sistema reagente e aumentano la potenza che è possibile trasferire tramite agitazione, servono ad aumentare la turbolenza.

Se non abbiamo un sistema di frangiflutti creiamo dei vortici all'interno della massa reagente, se il vortice si estende fino alla pala questa viene scaricata perché l'aria raggiunge la pala e quindi diminuisce il carico sulla pala stessa, questo può portare all'aumento della velocità di rotazione della pala oppure lo stesso sistema di controllo aumenta la velocità della pala perché rileva una minore potenza e quindi per mantenere l'OTR cerca di mantenere la velocità di rotazione.

Se poi il vortice si rompe c'è un carico immediato istantaneo sulla pala che può portare a fenomeni catastrofici fino a rottura del comando dell'agitatore.

I vortici però contribuiscono alla buona miscelazione del liquido nel fermentatore; la turbolenza è essenziale per un buon trasferimento di calore e di massa

Lo sparger distribuisce le bolle di aria all'interno del reattore, lo sparger più semplice è un tubo con un singolo orifizio. All'aumentare della dimensione del reattore aumenta la richiesta di portata d'aria e quindi vengono realizzati sparger con geometria più complessa.

Lo sparger è posizionato al di sotto dell'agitatore più basso in maniera tale che l'aria venga condotta alle pale della turbina e quindi venga dispersa attraverso tutta la massa reagente.

Lo sparger può essere: un tubo perforato, un sistema fatto a flauto o può essere fatto di vetro sinterizzato. Non c'è una grossa influenza della geometria dello sparger sulla distribuzione dell'aria se si ha un sistema di agitazione efficace.

Utilizzare un sistema con vetro sinterizzato genera un sistema con bolle più piccole ma è più difficile da pulire e quindi si ha più rischio di contaminazione.

Un altro modo di introdurre aria è un sistema a venturi in cui si introduce il substrato in un sistema divergente/convergente e questo richiama l'aria e quindi si ha ingresso nel reattore di un sistema in cui il substrato si trasporta l'aria sotto forma di bolle uniformemente disperse al suo interno → è un iniettore bifasico in cui iniettiamo miscela di substrato-aria. Lo sparger quindi distribuisce aria sotto forma di colonne di bolle. I sistemi più utilizzati sono o il singolo tubo o il sistema ad anello toroidale. Lo sparger anulare toroidale offre una maggiore aerazione permettendo così di trasportare una maggiore quantità di aria al reattore, è costituito da un tubo perforato ed è meno soggetto ad intasamento e sporcamento, ha circa lo stesso diametro della girante e deve essere posizionato al di sotto di esso. Le bolle vengono poi disperse all'interno del reattore e la dimensione delle bolle viene ridotta dal sistema di agitazione; la risalita delle bolle attraverso le pale della girante ne favorisce la rottura.

La dimensione dei fori (e delle bolle) non è così importante se si ha un buon sistema di agitazione.

Normalmente la posizione dello sparger è fissa → più facile la costruzione del reattore.

In alcuni casi, soprattutto per i reattori da laboratorio, per avere una maggiore flessibilità (adatto sia a velocità di agitazione diverse che a portate di aria diversa) si può avere uno sparger con posizione modificabile ma abbiamo un sistema con complessità maggiore dal punto di vista costruttivo.

Alta flessibilità: da un lato possiamo gestire reazioni e condizioni diverse in uno stesso recipiente e dall'altro abbiamo complessità maggiore del sistema e quindi minore efficacia e robustezza del reattore stesso.

Per i reattori industriali è più difficile avere cambiamenti di questo tipo.

Normalmente i fori vanno da 0.25 a 3 cm in funzione della portata d'aria → fori più piccoli, bolle più piccole ma maggior pressione per garantire la stessa portata d'aria.

Il flusso d'aria è controllata quindi dalla pressione di ingresso, è desiderabile avere bolle piccole MA se le bolle hanno un diametro molto più piccolo del mm, il tempo di equilibratura della conc di O_2 nel gas è quasi istantaneo e quindi l'hold up, la frazione volumetrica di gas nel liquido, non rappresenta più la capacità del sistema di favorire il trasporto di massa dell' O_2 , oltretutto la presenza di piccole bolle aumenta la viscosità dei fluidi non newtoniani e quindi riduce la mobilità delle bolle e diminuisce la potenza distribuibile all'asse dell'agitatore.

Una delle difficoltà principali nella conduzione di un processo di fermentazione è legata alle condizioni di mantenere l'asepsi nel reattore, dobbiamo sterilizzarlo prima di far partire la reazione e bisogna poi alimentare sia il nutriente che l'aria dopo averli sterilizzati. I reattori di laboratorio sono spesso fatti di vetro e sono spesso sterilizzati in autoclave con il mezzo di reazione (se non subisce danni per effetto del calore) insieme a tutti i sistemi di misura.

I reattori industriali invece possono essere sterilizzati in situ con una corrente di vapore nella camicia esterna, il sistema è riscaldato fino a 90°C, in questa fase di riscaldamento la fase di sfiato è mantenuta aperta e dopodiché viene iniettato del vapore direttamente nel mezzo di cultura fino a 120° C evitando la condensazione dell'acqua e in questo modo viene sterilizzato sia il reattore che tutte le linee di collegamento.

Il processo di sterilizzazione deve coinvolgere tutte le linee comprese quelle di campionamento, tutti i porti di strumentazioni, i sistemi di misura e tutti i sensori associati al reattore.

È necessario anche sterilizzare l'aria in ingresso e l'aria in uscita in quanto il sistema non deve permettere la fuoriuscita di microrganismi all'esterno per garantire sia la qualità e le proprietà della produzione sia per garantire la sicurezza dei lavoratori e della popolazione che vive in prossimità. Necessario dunque filtrare aria in ingresso e uscita.

Tipicamente l'aria contiene 10^3 - 10^4 microorganismi/m³.

Aria in ingresso sterilizzata per filtrazione e il filtro è sterilizzato con del vapore.

Il compressore deve avere una P sufficiente per vincere le perdite di carico nel filtro e nello sparger e attraverso il fluido di reazione. Durante tutte le fasi del processo il bioreattore deve essere mantenuto sotto pressione per evitare l'ingresso di contaminanti nel reattore.

Vi è la possibilità di formazione di schiume all'interno del reattore. Uno schiumeggiamento eccessivo può portare all'allagamento dei filtri d'aria in uscita (quindi contaminazione dei filtri e aumento delle perdite di carico quindi

perdita del mezzo di reazione e danneggiamento del reattore) e all'aumento di P con perdita del brodo di cultura e danneggiamento al reattore.

Lo schiumeggiamento è dovuto alla presenza di tensioattivi, condizioni nutritive limitate e dalla lisi cellulare.

La schiuma può essere controllata con agenti antischioma (es. poliglicoli polimerici a blocchi oppure polimeri siliconici o oli vegetali). L'antischioma ha il compito di far coalescere le bolle → se abbiamo troppa antischioma diminuiamo l'OTR perché diminuiamo la sup di scambio per cui l'antischioma deve essere dosato nella quantità necessaria.

È necessario un sistema di misurazione del livello di schiuma ad esempio possiamo avere due misuratori di livello e quando il sensore del livello superiore non sente la presenza di fluido allora vuol dire che non c'è schiuma e non c'è bisogno di aggiungere antischioma quando invece il livello raggiunge il sensore superiore significa che si ha aumento della schiuma nel reattore e quindi viene addizionato l'antischioma finché il livello della schiuma non si abbassa dal livello del sensore.

La risposta del sistema all'aggiunta di un antischioma dipende dal mezzo di reazione e dalla risposta dei microrganismi all'aggiunta di antischioma.

Possiamo avere 1) caso che è quello ideale nella quale abbiamo formazione di schiuma, aggiungiamo l'antischioma e questo serve a stabilizzare il livello di schiuma nel reattore, 2) l'aggiunta dell'antischioma abbassa il livello della schiuma e poi questo rimane ad un livello basso e costante → risponde bene all'antischioma, 3) in cui inizialmente la schiuma è ridotta ma poi aumenta di nuovo per poi stabilizzarsi, significa che l'antischioma introdotto è in parte metabolizzato per formare tensioattivi basso schiumogeni che servono a controllare la schiuma a tempi più lunghi, 4) il sistema inizialmente contiene un'antischioma che viene poi parzialmente metabolizzato, possiamo avere fenomeni di autolisi che generano sostanze schiumogene e la schiuma può essere aumentata o ridotta dall'antischioma.

L'antischioma deve essere non tossico per i microrganismi, specialmente se il prodotto di fermentazione è destinato a uso interno. Non devono avere nessuna influenza su gusto e odore perché questo causerebbe perdite economiche.

Devono poter resistere alle condizioni di reazione per cui se ad esempio carichiamo antischioma assieme al substrato e poi effettuiamo la sterilizzazione, l'antischioma deve resistere alle cond di sterilizzazione.

L'antischioma non deve essere metabolizzato dal microrganismo e deve essere aggiunto in maniera tale da non limitare la velocità di trasferimento dell'O₂, devono essere efficaci a basse conc.

Devono essere economici e avere un effetto che deve durare a lungo nel tempo.

Tipicamente si usano reattori che sono dei recipienti cilindrici con basi ellittiche, questa base rispetto a quella piana ha dei vantaggi: facilita la miscelazione, resiste ad alte P e consente una più facile pulizia.

Ha dimensioni standard e i rapporti diametro/altezza sono tali da ottimizzare sia l'efficacia della miscelazione che le caratteristiche strutturali del recipiente.

Le dimensioni devono essere anche adatte all'introduzione e all'implementazione di uno sparger.

L'altezza di reattore a parità del volume diminuisce con il quadrato del diametro.

Non tutto il volume del recipiente è volume utile, vi è un volume operativo (60-70%) ed è la frazione di volume occupata dal mezzo di coltura. Al di sopra del volume operativo vi è lo spazio di testa che è dimensionato in maniera tale da fornire spazio sufficiente per il rilascio delle bolle ed evitare che la schiuma possa contaminare la linea d'uscita dell'aria. Se il mezzo ha una tendenza a formare schiuma più rapidamente è necessario operare con volumi più piccoli. Nel calcolo del volume di lavoro è necessario includere il volume di hold-up (volume di gas intrappolato nel liquido).

CONTROLLO DI T: su scala di laboratorio il riscaldamento viene fatto con delle calze elettriche e il raffreddamento con acqua di rubinetto, nei sistemi industriali riscaldamento con vapore e raffreddamento con torre di raffreddamento oppure cicli frigoriferi ad ammoniaca. Nei sistemi industriali il riscaldamento è necessario durante lo start-up e lo shut-down ed è necessario anche durante le fasi di sterilizzazione.

Durante l'esercizio è necessario raffreddare perché le reazioni di crescita degli organismi sono tutte esotermiche e quindi dobbiamo smaltire calore di reazione e anche il calore causato dalla miscelazione e potenza legata all'insufflazione dell'aria nel reattore.

Per lo scambio termico abbiamo diverse configurazioni: camicia esterna o serpentino esterno. Quelli con serpentini interni garantiscono un buon trasferimento di Q ma sono da usare con cautela perché complicano la pulizia del reattore e sono una possibile sorgente di contaminazione del sistema in fase di reazione se dovessimo avere perdite di refrigerante (che non è sterilizzato).

È anche possibile avere uno scambiatore di calore all'esterno.

La corrente di aria in uscita è satura di acqua quindi esiste la possibilità di avere **condensazione** all'interno del filtro contaminandolo e portando all'allagamento del filtro con aumento di perdite di carico → si introduce un condensatore in maniera tale da desaturare la corrente di aria in uscita. È un metodo usato principalmente nei reattori con piccole dimensioni. Nei reattori industriali solitamente abbiamo un riscaldamento dell'aria in uscita in maniera tale da surriscaldarla e quindi evitare la condensazione all'interno del filtro.

CONTROLLO pH: bisogna avere un sistema di misura per il pH.

KOH migliore del NaOH perché meno tossico per i microorganismi anche se è più caro.

HCl troppo corrosivo per l'acciaio mentre H_2SO_4 deve essere usato in determinati range.

CONTROLLO DI O_2 DISCIOLTO: Sistema che comanda la portata di aria in ingresso sia in continuo che in misura intermittente o che comanda la composizione del gas all'interno del reattore (controllando rapporto O_2 , N_2 e CO_2).

SHEAR STRESS

La viscosità è importante per la conduzione dei bioreattori. È importante perché la presenza di alti shear stress all'interno del fluido reagente può portare al danneggiamento degli organismi in fase di crescita.

La viscosità descrive la forza di taglio necessaria da fornire al sistema per mantenerlo di moto costante.

Ci sono dei limiti di velocità di agitazione e quindi di potenza all'agitatore caratteristici di ciascun organismo.

Quindi in funzione dell'organismo abbiamo velocità massime delle pale dell'agitatore. In funzione dello shear stress si può avere inibizione della crescita o distruzione dell'organismo. La velocità di reazione e produttività sono influenzate dal sistema di agitazione per cui gli effetti di questo sono importanti nel processo industriale.

In particolare le cellule animali, vegetali e le alghe sono le più sensibili allo shear.

Per diminuire l'effetto dello shear stress si possono aggiungere al sistema degli agenti protettivi cioè agenti di viscosità che aumentano lievemente la viscosità del mezzo in maniera tale da diminuire la velocità di scorrimento e quindi proteggere i microrganismi. Es. eteri di cellulosa, derivati degli amidi, polimeri, glicoli polietilenici ecc...

Un'altra possibilità per diminuire lo shear stress è immobilizzare in un substrato la massa biologica.

BIOCATALIZZATORI

Due tipi di biocatalizzatori sono utilizzati più frequentemente nella produzione industriale: gli enzimi e le cellule o i microrganismi. Cellule e microrganismi utilizzati in operazioni di fermentazione, enzimi in bioconversione e biocatalisi. I processi di fermentazione coinvolgono la crescita di microrganismi o di cellule che catalizzano il processo → processo autocatalitico. Lo sviluppo comporta ricerca di sistemi di reazione che permettono di ottimizzare il processo.

In biochimica queste reazioni di biocatalisi possono essere una via metabolica per produrre energia dove la sostanza organica è usata come accettori di elettroni invece dell'ossigeno.

I parametri che determinano la scelta del catalizzatore sono il tipo di processo e le condizioni sperimentali che devono essere mantenute per permettere la crescita degli organismi.

In queste reazioni enzimatiche se l'enzima è alimentato al reattore in soluzione abbandona il reattore assieme al prodotto (perdo l'enzima). L'enzima quindi può essere un elemento costoso del processo e dall'altra parte può rappresentare una contaminazione non voluta del prodotto che può essere difficilmente rimovibile.

Per evitare questi effetti l'enzima può essere **immobilizzato** in maniera tale che rimanga all'interno del reattore.

Ci sono metodi chimici e metodi fisici per immobilizzare gli enzimi.

METODI CHIMICI:

1) **Legame chimico covalente** con un supporto solido insolubile che può essere un vetro poroso o una ceramica porosa, acciaio inossidabile, sabbia, carbone attivo, ossidi metallici o diverse schiume polimeriche. Gli enzimi sono normalmente legati al substrato attraverso gruppi amminici e carbossilici che devono essere quelli NON coinvolti nell'attività catalitica e nemmeno vicini per evitare interazione steriche. Il processo è completato in due fasi: attivazione del supporto (ad area superficiale elevata) e la reazione dell'enzima sul supporto.

2) **Reticolazione** con reagenti polifunzionali (tipicamente aldeidi). Le particelle vengono reticolate e formano una sorta di gel che non ha proprietà meccaniche proprie elevate. Le caratteristiche migliori le si hanno adsorbendo l'enzima sul supporto e reticolando l'enzima dopo l'adsorbimento, in questo modo il gel che si forma viene fissato sul supporto solido e quindi resiste meglio alle condizioni di operazione del reattore.

METODI FISICI

1) **Inclusione in fibre vuote o porose.**

2) **Inclusione in un gel polimerico**, si aggiunge l'enzima ad una soluzione di monomeri e poi inizia la polimerizzazione.

3) **Incapsulazione**, l'enzima viene inglobato in capsule di dimensioni micrometriche fatte di materiale poroso, permette il trasporto del substrato e del prodotto ma non dell'enzima. All'interno della capsula l'enzima è in soluzione. L'immobilizzazione da una maggiore stabilità all'enzima contro gli agenti che causano la perdita e il cambiamento della sua conformazione, lo svantaggio è che è necessario introdurre una resistenza diffusiva al trasferimento del substrato all'interno della microcapsula e del prodotto all'esterno.

Si forma quindi un gradiente di concentrazione all'interno della particella.

Reattori aerati ma non agitati

BUBBLE COLUMN REACTORS (BCR)

In questi reattori la miscelazione viene garantita soltanto dal flusso di gas all'interno, ho minori sforzi di taglio e quindi questi reattori sono adatti a organismi sensibili alle condizioni di shear stress durante la crescita.

La geometria del BCR deve permettere un lungo tempo di residenza delle bolle all'interno del fermentatore.

Reattore snello con elevata h rispetto al D . Ha una zona di elevata pressione idrostatica vicino allo sparger alla base del reattore. La velocità del liquido è una funzione della portata di gas.

I vantaggi sono: disegno economico del reattore, facilita di mantenere le condizioni di sterilità e basse possibilità di contaminazione, svantaggio: limitata capacità di trasferimento di O_2 .

Il moto del liquido è un moto equicorrente al moto di gas. Tempo di miscelazione in funzione della portata di gas e delle caratteristiche geometriche del reattore. Per i reattori di grande dimensione è necessario prevedere l'inserimento di setti all'interno del reattore per evitare la coalescenza delle bolle e ridurre le dimensioni delle bolle (che si riducono anche per effetto della pressione idrostatica dal basso verso l'alto del reattore). Posso avere o setti perforati che generano bolle di piccole dimensioni o pacchi lamellari che evitano la coalescenza delle bolle.

REATTORI AIR-LIFT

Hanno al loro interno un tubo di contenimento, vi è circolazione del fluido che viene portato in alto insieme ai gas nei riser e scende verso il basso nel downcomer sfruttando la differente densità del liquido aerato rispetto al liquido non aerato.

Sono reattori più costosi rispetto ai BCR, sono possibile diverse tipologie a seconda di avere il draft tube interno o esterno, questo è funzione delle esigenze di trasferimento del calore.

L'effetto del draft tube è che aumenta la mix assiale, genera una circolazione del fluido all'interno del reattore e riduce la coalescenza delle bolle per effetto della circolazione.

Nei reattori air-lift ci sono 3 regioni: air-riser, down-comer e zona di liberazione delle bolle e abbattimento della schiuma. L'air-riser è la zona dove viene posizionato lo sparger.

L'air-riser esterno è preferito nelle installazioni di larga scala perché permette un migliore trasferimento di calore.

L'efficienza della miscelazione è determinata dal flusso verticale delle bolle che trasportano verso l'alto il liquido, liquido che si libera dalle bolle nella zona di disengagement e che riscende poi nel down-comer.

Le bolle viaggiano in una direzione ad una velocità quasi uniforme, questo riduce la coalescenza e determina un OTR più alto rispetto ai BCR.

In un reattore air-lift viene assicurata una circolazione del fluido e una migliore omogeneità rispetto ai BCR.

La zona di disengagement deve fornire il volume al reattore in maniera tale da permettere un volume sufficiente per l'hold-up e serve come zona di abbattimento della schiuma.

L'espansione del diametro di reattore nella zona di disengagement abbassa la velocità delle bolle e questo aiuta la separazione dei gas dal liquido; le bolle avendo velocità più bassa abbassano la possibilità di formazione di aerosol cioè trascinalo di goccioline di liquido nell'aria in uscita e quindi si ha meno possibilità di contaminazione del filtro dell'aria d'uscita. Anche il flusso assiale che viene generato aiuta alla riduzione della formazione di schiuma.

I vantaggi di un air-lift è che sono a basso shear, possono essere utilizzati organismi sensibili agli effetti di sforzi di taglio (cellule animali o vegetali), non c'è agitazione quindi è più facile mantenere la sterilità del sistema.

Non ho problemi delle tenute dell'asse dell'agitatore.

In un reattore di grande dimensioni la P alla base del reattore aumenta la solubilità dell' O_2 aumentando così la velocità di trasporto dell' O_2 (aumenta la forza motrice al trasporto). Possono essere costruiti reattori molto grandi.

Gli svantaggi sono: alti costi di investimento e alti costi di esercizio, anche se non è richiesto un agitatore è richiesta un'alta portata d'aria e un'elevata P per vincere la P idrostatica alla base del reattore.

L'omogeneità del mezzo di reazione è meno buona che nel caso di un reattore agitato per cui i microrganismi si trovano in condizioni diverse nei diversi punti del reattore, è impossibile mantenere prossimi al massimo il valore di μ_x cioè il valore massimo di crescita perché è impossibile mantenere livelli di carbonio e nutrienti al massimo.

La separazione del gas dal liquido non è molto efficace quando è presente schiuma.

Nella progettazione quindi degli air-lift questi svantaggi devono essere minimizzati → necessario mantenere una buona omogeneità in modo tale da evitare cicli di crescita elevati seguiti da cicli in cui i nutrienti sono limitanti.

È possibile pensare a punti di iniezione multipli, in questo modo si cerca di mantenere una maggiore omogeneità del flusso reagente. I reattori air-lift tendono a non avere una zona di sforzi di taglio elevati in prossimità delle pale, questo limita il possibile danneggiamento dei microrganismi e aumenta la loro produttività rispetto ai reattori agitati STR.

REATTORI A LETTO IMPACCATO

Sono reattori nella quale è presente una fase solida che è un supporto sulla quale sono immobilizzate cellule/enzimi assieme ad un eluente. Il volume del reattore può essere riempito interamente da fattori di riempimento e dal liquido. Normalmente i reattori aerobici sono organizzati in maniera tale che il liquido sgoccioli, lambendo le particelle solide, in controcorrente alla corrente di fase di gas che scorre dal basso verso l'alto.

Vantaggi: costruzione semplice ed economica, sono ottimali per reazioni enzimatiche e per il trattamento delle acque reflue. Svantaggi: non si ha controllo dei cammini del liquido, si possono formare degli aggregati nelle particelle di riempimento oppure cammini preferenziali con delle scorciatoie che riducono il tempo di permanenza del fluido all'interno del reattore.

REATTORI TRICKLE-BED

Sono reattori a letto impaccato nei quali la fase liquida sgocciola sulle particelle solide che non sono completamente immerse nel liquido. Il liquido scorre sulla superficie del solido dove sono state immobilizzate le cellule/gli enzimi.

Il film liquido è molto sottile in maniera da permettere un efficace trasporto di O_2 nei processi aerobici.

Sono usati nei trattamenti delle acque reflue via anaerobia.

REATTORI A LETTO FISSO

I microrganismi sono immobilizzati per adsorbimento o per incapsulazione.

Diversi tipi di substrato su cui possono essere immobilizzati sono: polimeri, schiume polimeriche, elementi in calcestruzzo, scarti di legno o materiale fibroso come materiale plastico o lana di vetro. Il liquido è pompato attraverso il solido o è lasciato sgocciolare sulla sua superficie quando il substrato è convertito direttamente nel prodotto.

Es: trasformazione steroidi, trattamento acque reflue, produzioni di enzimi o amminoacidi.

REATTORI A LETTO FLUIDO

Gli organismi sono immobilizzati in particelle di piccole dimensioni.

La piccola dimensione del supporto aumenta la sup specifica di immobilizzazione e favorisce il trasporto di materia.

Le particelle sono leggere e quindi possono essere sostenute all'interno del fluido, la fluidizzazione delle particelle solide nel reattore fa sì che le superfici delle particelle vengano continuamente ricambiate aumentando il coefficiente di trasferimento di massa.

I letti fluidi possono essere bifasici (nel caso di sistemi non aerati) o tiffasici (sistemi aerati con sparger).

Sono usati per impianti di trattamento di acque reflue.

Vengono utilizzate cellule animali, sono intrappolate in geli o incapsulate all'interno di microcapsule.

Nei sistemi a letto fluido l'introduzione del substrato e dell'aria è in equicorrente, servono a fluidizzare le particelle solide sulle quali sono immobilizzati i microrganismi.

Questi reattori permettono di avere conc di biomassa elevata e avere trasferimento di massa nei reattori continui.

La miscelazione in un bioreattore è assicurata dalla pompa di circolazione (uno dei pochi reattori con questo meccanismo). I reattori comportano immobilizzazione degli organismi su un mezzo, il flusso/ricircolo del mezzo di reazione e dell'aria è equicorrente verticale.

In questi casi è possibile realizzare delle configurazioni che includono uno sparger ed un draft-tube.

SISTEMI A CELLULE FLOCCULATE: sistemi nei quali le cellule sono trattenute nel reattore in quanto formano dei fiocchi. Durante la reazione le cellule coagulano e precipitano sul fondo del reattore.

Sono sistemi normalmente usati per il trattamento anaerobio di acque reflue. In questi processi anaerobici i batteri metanogenici hanno una tendenza naturale a flocculare, si formano fiocchi che vengono agitati dal rilascio dei gas dovuti alla fermentazione (CH_4 e CO_2). I sistemi flocculati di grande dimensione sono usati per la digestione anaerobia di acque di scarico industriali ad alta carica inquinante.

Questi reattori sono egg-shaped (forma di uovo) perché così si migliora il movimento dei fiocchi all'interno del reattore senza presenza di zone morte.

SISTEMI A RICIRCOLAZIONE: sistemi agitati nella quale separo la corrente d'efflusso; separo la biomassa e questa la ricircolo all'interno del reattore.

Reattori a letto fisso vs reattori a letto fluido

I reattori a letto fluido sono più efficaci dei reattori a letto fisso perché 1) è possibile immobilizzare una maggiore quantità di cellule nel reattore, le particelle fluidizzate hanno una superficie più ampia.

2) La velocità di trasferimento della massa è favorita da una superficie più grande e dalla miscelazione più efficace nel reattore. 3) I reattori a letto fluido sono meno soggetti a fenomeni di intasamento rispetto ai letti fissi.

I reattori a letto fluido sono più difficili da progettare perché è necessario assicurare il flusso corretto per garantire la fluidizzazione ed evitare il trasporto delle particelle fuori dal reattore. Le dimensioni delle bolle devono essere controllate, è importante evitare la fuoriuscita delle cellule dal reattore e il desorbimento. È necessario evitare lo stripping delle cellule dalla superficie del substrato e evitare il danneggiamento del supporto che porterebbe a una separazione degli organismi dal supporto stesso.

REATTORI A MEMBRANA

Caratteristica fondamentale: presenza di una membrana semi permeabile che permette il passaggio dei prodotti ma trattenendo gli enzimi. La membrana è interna al reattore.

La membrana è normalmente costituita da fibre tubulari cave con diametro di circa 250 μm e spessori di circa 50 μm . Possono essere sia batch che reattori continui, permettono una facile separazione tra l'enzima e i prodotti di reazione. Sono usati per sistemi con enzimi in soluzione in maniera tale da evitare gli svantaggi dell'immobilizzazione dell'enzima con i fenomeni di limitazione diffusiva associate alla immobilizzazione.

Permettono un rinnovo dell'enzima in sistemi in cui si utilizzano enzimi termolabili.

Il principale svantaggio riguarda il costo della membrana e la necessità di sostituirla a scadenze fisse.

Nel caso di microrganismo immobilizzato, il vantaggio è: avere un'alta concentrazione di organismi che permette flussi elevati e quindi maggiore produttività per unità di volume del reattore, di poter riutilizzare le cellule evitando costi associati alla separazione e al riciclo, favorisce la stabilità genetica e la sensibilità degli organismi è ridotta agli sforzi di taglio.

Gli svantaggi sono che molto spesso il prodotto ottenuto è estratto dalle cellule, non posso immobilizzare la cellula sul substrato perché quel che voglio ottenere è un prodotto intra cellulare. Introduco poi delle limitazioni diffusive, è più difficile mantenere un'omogeneità del sistema, il microambiente è più difficile, la crescita delle cellule e lo sviluppo di gas può determinare la disintegrazione del substrato causando la perdita dei microrganismi.

FOTOBIOREATTORI

Sono utilizzati per alghe e cianobatteri, la difficoltà è quella di fornire luce alla biomassa senza avere fotoinibizione (cioè insolazione eccessiva). Se non è necessario avere una cultura monosettica vengono utilizzati pond reactors (reattori ad allungaggio?). Le lagune non devono essere troppo profonde in modo tale da poter avere irraggiamento su tutta la biomassa (per le alghe ho 15 cm). Per ottimizzare la produzione viene fatta una blanda agitazione o una ricircolazione.

DESIGN DEL BIOREATTORE

La progettazione dei reattori deve tener conto degli aspetti di sicurezza e degli aspetti normativi.

Quanto questi siano limitanti dipende dalla natura del prodotto e dal suo uso, dal processo e da dove viene fisicamente posizionato il reattore.

È fondamentale il contenimento ossia evitare la fuoriuscita dal reattore di prodotti di fermentazione o microrganismi in maniera tale da assicurare sicurezza dei lavoratori e comunità.

I livelli di confinamento necessari sono stabiliti dall'organismo di controllo di ciascuna nazione.

La sicurezza fisica deve essere garantita.

Altro aspetto di sicurezza: sicurezza del prodotto, devo garantire che il prodotto non sia contaminato.

Le GMP (good manufacturing practices) richiedono che il prodotto possa essere riprodotto e che soddisfi le specifiche approvate e dichiarate dagli enti regolatori del prodotto.

Il non avere controllo sul processo di fermentazione determina un rischio sulla qualità del prodotto finale.

Fondamentale è l'operazione di sterilizzazione: il recipiente e tutte le linee che portano al recipiente devono essere sterilizzabili. Le tubazioni a contatto con il fluido di processo inclusi additivi e agenti antischiuma e tutto ciò che possono fornire delle vie di ingresso devono essere sterilizzate in qualsiasi movimento durante la fermentazione.

I gas di ingresso devono essere sterilizzati prima che entrino in contatto con qualsiasi tubazione di processo sterile, tutti gli accessi al recipiente (che siano le tenute dell'albero motore oppure i portelli di campionamento oppure i portelli per gli strumenti di misura) devono essere sterilizzabili.

Oltre a questo è necessaria la validazione, non è sufficiente che io progetti in maniera tale da avere un controllo sulle cond di processo ma devo fornire un'evidenza documentale che dimostri un elevato grado di controllo dello specifico processo. Devo dunque dimostrare che il controllo è mantenuto anche nel caso peggiore e alla presenza dell'evento catastrofico. La progettazione deve essere fatta in maniera tale da rendere la validazione più facile possibile e di conseguenza bisogna seguire le regole di GMP e le regole di manutenzione.

La progettazione di un fermentatore inizia con il considerare l'esigenza del processo riguardo al trasferimento di O_2 , calore, miscelazione e necessità di potenza all'agitatore.

Il trasferimento di massa e il trasferimento di Q e la mix del fluido dipendono dalle caratteristiche reologiche del mezzo. Le caratteristiche reologiche di brodi di cultura di funghi impongono dei limiti severi, ad esempio la velocità di trasferimento di Q e O_2 può essere diversa da 50 al 5% rispetto alle tipiche fermentazioni dei batteri.

L'omogeneità della miscela è molto peggiore che nei brodi di coltura newtoniani, questo rende anche più difficile la misura e il controllo.

Trasferimento di massa

Il primo passo è garantire l'OTR (oxygen transfer rate) dato dalla massima velocità di reazione per la resa di microrganismi per unità di ossigeno. L'OTR è una funzione della portata di gas e della velocità lineare del gas.

La P totale e la frazione molare di O_2 influenzano la P parziale dell' O_2 direttamente, l'aumento della portata di gas aumenta la frazione in uscita e quindi aumenta la forza motrice.

Equazioni usate come guide qualitative o semi quantitative, sono valide solo a condizioni prossime a quelle che hanno portato alla loro formazione. La geometria del reattore ha un'influenza importante sulle costanti all'interno delle equazioni. Sono relazioni che non scalano molto bene.

Nel caso di materiali di brodi di coltura non newtoniani, il trasferimento di massa è migliore con turbine che hanno componenti assiali rispetto ad esempio a turbine radiali mentre con brodi newtoniani non vi è molta differenza.

La potenza serve sia per la dispersione dei gas che per la miscelazione globale e quindi per avere omogeneità della massa reagente. Nei sistemi agitati la potenza è data sia tramite l'agitatore che con l'insufflare dei gas.

Le condizioni di flooding si hanno quando l'aria forma una camicia intorno alla turbina diminuendo la potenza massima che può essere fornita dalla turbina di agitazione al fluido. Questo fenomeno di flooding è più elevato in brodi di coltura viscosi con comportamento pseudoplastico (come ad esempio sistemi di miceli o sistemi in cui i nutrienti sono polisaccaridi). Pseudo plastico → la viscosità diminuisce all'aumentare della velocità di agitazione.

Il fenomeno di flooding è descritto dal n° di aerazione, questo è definito come il rapporto tra la potenza che il sistema di agitazione è in grado di fornire al fluido in presenza di aerazione rispetto alla potenza che il sistema di agitazione può fornire in assenza di aerazione. Il n° di aerazione dipende dalla velocità dei gas e dalle caratteristiche geometriche dell'impeller (suo diametro e sua velocità di rotazione).

La potenza in condizioni non aerate è descritta dal n° di potenza che è funzione delle condizioni di agitazione del sistema. Alcuni agitatori che hanno elevato n° di potenza si possono scaricare in maniera sensibile in cond aerate, è il caso delle turbine Rushton con brodi di coltura non newtoniani. Per esempio una turbina a pale inclinate tende a non scaricarsi.

Se voglio aumentare l'OTR aumento l'agitazione (aumento il K_L o K_G) però la velocità di agitazione è limitata dalla frequenza naturale del sistema di agitazione, se mi avvicino a questa posso introdurre delle vibrazioni pericolose che possono portare fino alla rottura dell'albero di comando → cerco di non eccedere del 70% della frequenza naturale del sistema di comando.

Inoltre la velocità di rotazione è limitata se sto conducendo una reazione con microrganismi sensibili agli effetti dello shear stress. Questo dipende molto anche dalle dimensioni del reattore. In generale se ho microrganismi sensibili agli sforzi di shear devo cercare di mantenere la velocità dell'agitatore inferiore ad una soglia.

L'hold up diminuisce il volume efficace del reattore. La formatura di schiuma può limitare l'operatività del reattore e causare problemi di pulizia di asepsi e può contaminare l'uscita del reattore e in casi estremi può portare alla terminazione del reattore.

Trasporto di calore

Il calore che dobbiamo smaltire durante la reazione è dato dalla reazione metabolica + il calore dissipato dato dall'introduzione della potenza. Il maggior trasferimento di calore lo si ha durante il periodo di massima crescita.

Calore smaltito con sistemi di scambio termico caratterizzati dai loro coefficienti di trasmissione, questi tengono conto delle resistenze in serie come resistenza nel film del fluido di raffreddamento, resistenza nel film del brodo di coltura, resistenza di sporcamento (fouling) dal lato fluido di raffreddamento e il fouling dal lato brodo di coltura più la resistenza legata allo spessore del mantello del reattore.

Anche il coefficiente di trasferimento di calore (così come quello di trasferimento dell'ossigeno) è superiore per i brodi di fluidi newtoniani rispetto ai brodi di fluidi non newtoniani.

Un parametro fondamentale da tenere in conto nella progettazione dei reattori è che devono essere sterilizzabili.

Tra i problemi che possono essere causati dai problemi di contaminazione vi è per esempio la produzione di tossine che non possono essere rimosse da sistemi di purificazione.

Problema di una produzione di un enzima che degrada il prodotto oppure la diminuzione della resa del prodotto dovuta al minore utilizzo di substrato a causa dei contaminati. Le tossine inibiscono gli organismi. Ho anche per esempio possibile produzione di composti come polisaccaridi che interferiscono nelle operazioni di recupero e purificazione. Importante progettare un sistema prevedendo le operazioni di sterilizzazione.

Quando effettuiamo un cambiamento delle variabili non sempre otteniamo quel che vogliamo.

Ad esempio abbiamo modificato il nutriente perché in questo modo la resa sulla base del nutriente aumenta e quindi abbiamo maggior velocità di crescita dell'organismo e quindi dobbiamo aumentare il trasferimento dell' O_2 rispetto al valore di base di conduzione dell'impianto precedente. Ciò che possiamo fare è aumentare la portata di aria, aumentandola aumentiamo la conc di O_2 nella corrente d'uscita e quindi aumentiamo la forza motrice al trasferimento di O_2 . Non è però l'unico effetto che otteniamo, andando ad aumentare la portata d'aria aumentiamo anche la velocità lineare del gas e quindi aumentiamo la turbolenza, diminuimo lo spessore dello strato limite del liquido e quindi aumentiamo il coefficiente di scambio. Aumentando la portata aumentiamo il n° di aerazione della turbina quindi diminuimo la potenza trasmessa all'asse, facendo questo riduciamo anche il coefficiente di scambio.

Quindi una modifica del processo per aumentare il coefficiente di scambio in realtà la fa diminuire.

Quando dobbiamo progettare un reattore dobbiamo seguire alcuni passi (una sorta di checklist).

Innanzitutto in funzione della portata del reattore (quindi del volume di reazione che vogliamo gestire) scegliamo la geometria del recipiente, questa deve adattarsi al luogo in cui vogliamo installare il reattore (spazi in altezza e in pianta). Poi bisogna soddisfare alcune regole generali rispetto alla mix di massa, la spaziatura delle turbine e via. Quindi dobbiamo fare una prima scelta sulla tipologia del reattore.

Dobbiamo verificare che la velocità lineare dei gas sia abbastanza bassa da evitare schiumeggiamenti, evitare formazione di aerosol nella corrente d'uscita che potrebbero contaminare e intasare il filtro dell'aria in uscita.

Dobbiamo rimanere nei limiti imposti dai componenti e dagli accessori senza andare a cond estreme di P e richiesta di

potenza che andrebbero ad aumentare i costi. Bisogna poi definire il tipo di agitatore, la sua dimensione e la sua velocità per poter dare una mix sufficiente alla massa di reazione e per garantire un buon trasferimento di O_2 . Bisogna soddisfare le regole della spaziatura delle diverse turbine. Meglio turbine con giranti fatte con un pezzo unico che assemblate perché semplifica i requisiti della pulizia del reattore.

Infine bisogna definire l'area di scambio termico, la portata e la T del fluido di refrigerazione per smaltire il calore di reazione. Bisogna avere uno scambio termico sufficiente per gestire le operazioni di sterilizzazione.

Nei limiti del possibile è meglio evitare serpentini interni perché problematici in fase di pulizia del reattore e sono possibili sorgenti di contaminazione (nel caso di perdite del fluido di refrigerazione che non è sterilizzato).

A questo punto affiniamo le diverse grandezze e si effettua la progettazione in dettaglio.

Primo caso) vogliamo produrre una proteina intracellulare, l'organismo che cresce è l'E.Coli, il V del reattore è 15000L e l'OTR massimo è 234 mmol/(L*h), l' O_2 disciolto per evitare condizioni di anossia è il 10% dell' O_2 disciolto in equilibrio alla Patm. Il brodo di crescita ha natura newtoniana e ha una bassa viscosità. L'organismo non necessita di autorizzazioni particolari, il confinamento ricade in uno dei casi più semplici. Abbiamo una portata massima e una T minima del fluido di raffreddamento, non vogliamo serpentini interni e si ha una P max e portata max del compressore per l'alimentazione dell'aria. Abbiamo definito anche un coefficiente di scambio termico e un coeff di scambio lato brodo di coltura (funzione delle caratteristiche reologiche del brodo stesso). Abbiamo limitazione poi in termini di altezza e piazza del capannone.

Il fornitore del reattore ci trasmette delle correlazioni sperimentali che ha sviluppato per le sue apparecchiature; le condizioni di flooding delle sue giranti sono espresse dal rapporto della potenza in presenza di gas rispetto alla potenza in condizioni di assenza di gas, ci viene dato anche l'hold up. Relazioni sviluppate per turbine Rushton non interagenti tra di loro (quindi una singola turbina).

Prima stima: valutare le dimensioni del reattore, definiamo un diametro del reattore, spessore della parete in funzione della P da mantenere all'interno del reattore, altezza di liquido (quindi volume utile), altezza totale del reattore.

Si fanno i primi conti sul trasferimento di ossigeno tenendo conto di quattro diverse ipotesi di operazioni a P diverse: due in condizioni di assenza di arricchimento di O_2 e due in condizioni di arricchimento di O_2 .

In funzione della portata di aria calcoliamo la potenza necessaria al reattore.

A P più bassa abbiamo bisogno di una potenza maggiore per soddisfare i requisiti di OTR imposti dalla reazione.

Abbiamo scelto 4 casi per vedere in quale di questi possiamo soddisfare al meglio i requisiti del sistema.

Si definiscono poi le cond di agitazioni, il diametro della turbina, la potenza in assenza di gas della turbina, abbiamo il n° di aerazione e grazie a questo abbiamo il rapporto tra la potenza in presenza e in assenza di gas quindi alla fine conosciamo la potenza che abbiamo bisogno in condizione di flusso d'aria.

Ultimo passaggio è calcolare i requisiti di scambio termico per raffreddare il reattore.

Abbiamo un carico termico, l'hold-up, una determinata altezza di liquido quindi un'area di scambio termico e sulla base di questa definiamo la portata di fluido di raffreddamento data la T minima del fluido stesso.

Dalla prima stima si capisce che l'arricchimento di O_2 non è necessario, non è però stupido prevedere dei bocchelli per poter avere in futuro un arricchimento di aria con ossigeno; questo perché il massimo flow rate è piuttosto elevato e vedendo anche la potenza massima del compressore notiamo che siamo un po' al limite quindi si rischia di non poter rispettare più l'OTR.

Il sistema di agitazione è calcolato basato sull'ipotesi di utilizzare 2 turbine Rushton di 100 cm di diametro ciascuna con una velocità di 150 rpm, questo ci dà un'agitazione sufficiente e un buon trasferimento di O_2 . Un'altra possibilità è avere una turbina con diametro maggiore e avere al di sopra un hydrofoil quindi un'elica che dà corrente assiale.

Le cond di scambio termico invece sono strette, se non si può mantenere la T del fluido di raffreddamento ma si aumenta anche soltanto del 10% il coefficiente di scambio termico non si riesce più a soddisfare il calore richiesto per raffreddare il reattore.

Secondo caso) brodo non newtoniano, alta viscosità (che diminuisce all'aumentare della velocità di agitazione), vogliamo produrre un antibiotico, microrganismo è streptomice, brodo finale con 15000 L, OTR 50 mmol/(L*h), requisito di 10% di O_2 disciolto rispetto alle cond atmosferiche, limiti imposti dal compressore, un coefficiente di trasferimento di calore che dipende dalle cond reologiche del brodo di coltura, limiti architettonici.

Abbiamo ancora delle relazioni date dal fornitore per progettare i flussi, sempre per turbine Rushton singole.

Facciamo ancora una *prima stima* delle dimensioni del reattore e poi ci facciamo una tabella di ipotesi di cond di

processo quindi P e conc di O_2 nella corrente gassosa (in assenza e in presenza di arricchimento di O_2), sulla base di questa ci riportiamo la portata di aria necessaria e la potenza necessaria all'asse per poter soddisfare i requisiti di OTR. Sulla base di questo definiamo le cond dell'agitatore, abbiamo una velocità di agitazione, una potenza in assenza di gas, n° di agitazione e di conseguenza una potenza in presenza di aria.

Definito in questo modo il sistema di agitazione come ultima cosa facciamo la verifica dello scambio termico per raffreddare il reattore, verifichiamo che la portata di raffreddamento sia supportata dal sistema che abbiamo. Notiamo che nonostante si riesca a rispettare l'OTR anche in assenza di arricchimento è comunque utile prevedere l'arricchimento, questo perché siamo stretti in termini di portata di aria (22000 SLPM) e in queste condizioni aumentare la velocità di agitazione rischia di mandare l'agitatore in flooding a causa delle caratteristiche non newtoniane del brodo di coltura.

Per poter avere dei margini operativi di controllo adeguato è meglio prevedere l'arricchimento.

Il sistema di agitazione viene calcolato sulla base di 2 turbine Rushton (più soggette a flooding che non gli hydrofoil) con D di un 1 m e velocità di 140 rpm, in alternativa turbina inferiore con D più largo e come turbina superiore mettiamo un hydrofoil che ci garantisce una migliore omogeneità del contenuto del reattore.

Per quello che riguarda il coeff di scambio termico siamo abbastanza al limite, se la max velocità di agitazione aumentasse non riusciremmo a fornire energia necessaria per raffreddare anche in presenza di sporco (→ è bene prevedere il sotto raffreddamento del liquido di refrigerazione).

MATERIALI DI COSTRUZIONE

1) Il tipo di metallo usato per i recipienti e i bocchelli

2) Il tipo di elastomero utilizzato per le guarnizioni

La scelta deve essere fatta sulla base della compatibilità degli organismi, dei prodotti, resistenza alla corrosione e facilità della pulizia nel reattore, le caratteristiche delle saldature, costo e durabilità dei materiali.

Tipicamente si usano acciai inossidabili mentre come materiale per le guarnizioni si possono usare silicone, viton, teflon o EPDM.

Bisogna tenere presente che il vapore puro e acqua pura sono altamente corrosivi.

Inoltre alcuni processi di formatura delle guarnizioni possono lasciare piccole tracce di metallo nelle sedi, queste possono essere non abbastanza per causare problemi alla fermentazione ma possono causare corrosione (che dopo contamina il brodo di coltura).

Un parametro importante della capacità di pulitura è la finitura superficiale che viene specificata o come grit (granulometria dell'abrasivo con la quale è lucidata la superficiale) o come rugosità.

I 2 modi più comuni per raggiungere un grado di finitura superficiale sufficiente è il polishing meccanico (fatto con una serie di abrasivi di dimensioni decrescenti) o electropolishing (fatto mediante rimozione elettrochimica della rugosità)

I cloruri danno pitting, forma di corrosione molto pericolosa perché non generalizzata e quindi si rischia di non accorgersene.

Le superfici possono anche essere passivate, fatte o con idrossido di sodio, acido citrico o acido nitrico ma sono trattamenti aggressivi; il metodo più dolce è farlo con agenti chelanti (si adsorbono sulla sup ed evitano la corrosione del metallo, sono tipicamente dei fosfonati).

I bocchelli devono essere tali da non favorire la formazione di sacche o zone di ristagno perché altrimenti la pulizia del reattore risulterebbe difficile e complicata. Bocchelli più usati: ingold e sanitary.

Devono essere auto drenanti, sono posizionati ad un angolo di 45°.

STERILIZZAZIONE

Per un sistema Batch la sterilizzazione viene effettuata prima dell'inizio della reazione: si riempie il recipiente con il substrato e il brodo di coltura e il flusso di vapore viene avviato attraverso la camicia, l'agitatore funziona a basse velocità e il vapore serve a lubrificare le tenute dell'albero di agitatore.

La linea di scarico è aperta in modo tale da poter scaricare la sovrappressione, tutte le altre valvole sono chiuse.

Si scalda il contenuto del reattore e intanto scarichiamo aria dal reattore fino a quando non raggiungiamo una T di 100°C, a questo punto il vapore continua a passare nella camicia, chiudiamo la linea di uscita dell'aria e l'unica fuoriuscita è attraverso le trappole del reattore.

Il vapore viene ora immesso attraverso la linea di ingresso dell'aria per sterilizzare il filtro di ingresso; il vapore che

esce dal recipiente attraverso la linea di scarico dell'aria sterilizza le tubazioni della linea di scarico e il filtro di scarico. Sterilizziamo con il vapore anche tutti i bocchelli sotto il livello del liquido e tutti i bocchelli di aggiunta di additivi e di prelievo del campione. Scaldiamo fino a T di 121°C (quindi P di 1 atm all'interno del reattore) per il tempo necessario per effettuare la sterilizzazione.

A questo punto chiudiamo le valvole, manteniamo la T cost e raffreddiamo poi il reattore.

TUBAZIONI

Sistema delle tubazioni auto drenante. Bisogna evitare possibilità di zone di ristagno dove può esserci contaminazione.

Le tubazioni del vapore di condensa devono essere almeno un 3/8 di pollice per garantire un drenaggio adeguato.

Le tubazioni devono essere le più corte possibili per semplificare operazione di sterilizzazione.

Non si devono usare valvole di non ritorno.

I portelli di ispezione visiva sono sostanzialmente inutili perché se per caso abbiamo brodi di coltura molto disomogenei non si riesce ad avere visione d'insieme, vengono utilizzati solo nelle linee di drenaggio del lubrificante delle tenute dell'albero di rotazione, questo per potersi accorgere per quanto possibile di eventuali perdite.

Prestare particolare attenzione all'orientamento delle tubazioni per evitare la possibilità di intrappolamenti d'aria e riscaldamento inadeguato. Valvola di fondo montata flush ossia a filo.

CONTROLLO CSTR

I parametri operativi di un bioreattore si possono dividere in 3 gruppi: parametri fisici (tempo, P, T, massa, V, caratteristiche agitatore ecc), chimici (pH, potenziale redox, O₂ e CO₂ disciolto, conc dei nutrienti come lipidi e carboidrati nel brodo di coltura ecc) e biologici (quoziente respiratorio, velocità di assorbimento di O₂, velocità di produzione di CO₂, densità ottica ecc). Misurare tutti questi parametri non è possibile → ci limiteremo alla misura di alcuni parametri che siano rappresentativi del processo.

Un parametro importante per giudicare l'efficacia del reattore e la vitalità degli organismi in crescita è la conc di O₂ disciolto, questo tipo di misura ha un tempo di ritardo notevole (fenomeni di ritardo devono essere tenuti in conto durante la progettazione del reattore).

A d una variazione di O₂ in fase gas corrisponde con un certo ritardo di tempo una conc di O₂ disciolto e con un ritardo di tempo ancora maggiore la risposta dell'elettrodo di misura dell'O₂ disciolto.

La misura dell'O₂ disciolto è difficile perché la sua solubilità nel brodo di coltura è bassa, ci sono diversi metodi per misurare la conc. In tutti questi metodi viene utilizzata una membrana semi permeabile per separare il sensore dal brodo di coltura. Tutti i sensori richiedono una calibrazione prima dell'uso.

Primo metodo: tubo semipermeabile immerso nel brodo di coltura e all'interno del tubo passa un gas inerte.

L'O₂ diffonde dal liquido fino al gas inerte e dopo viene analizzata la conc di O₂ trasportata dall'inerte.

Secondo metodo: spettrometro di massa separato dal brodo di coltura con la membrana semipermeabile che permette solo il trasporto di ossigeno.

Terzo metodo (quello più usato): sensori elettrochimici, ci sono due tipi di rilevatori: galvanici e i polarografici.

In entrambi i casi vengono utilizzate membrane per separare la cella elettrochimica dal brodo.

La membrana (come negli altri metodi) è permeabile all'O₂ e non agli altri componenti chimici che potrebbero anche interferire con la misura. L'O₂ diffonde attraverso la membrana fino alla cella elettrochimica nella quale viene ridotta al catodo e viene prodotta una corrente/tensione misurabili e proporzionali alla velocità di apporto di ossigeno al catodo. Controllo di pH fatto tramite un pHmetro che controlla l'aggiunta dei sistemi di neutralizzazione acidi/base.

Controllo del livello di schiuma: ci sono diversi metodi per analizzare il suo livello.

Metodi che misurano conducibilità, conduttività termica, sono degli elettrodi che quando sono raggiunti dalla schiuma vedono una modifica della conducibilità e conduttività termica causata dalla presenza della schiuma.

I sistemi che utilizzano conduttività termica sono sistemi in cui è dato un flusso di calore e viene misurato come il trasporto di calore cambia in presenza o assenza di schiuma; sono dei sistemi soggetti a sporcamento perché continuamente scaldati.

Ci sono anche dei detector ultrasuoni montati ai lati del recipiente, che misurano l'attenuazione alla trasmissione di ultrasuoni quando lo spazio tra trasmettitore e ricevitore è occupato dalla schiuma.

Un altro metodo è con il disco di rotazione, se raggiunto dalla schiuma questa ne abbassa la velocità di rotazione e quindi dà il segnale che la schiuma ha raggiunto quel livello, funziona anche come rompi schiuma.

BIOSENSORI

Costituito da 2 elementi principali: biosensore e trasduttore, vengono combinati in un unico strumento di misura.

Il biosensore funziona misurando le caratteristiche del brodo di coltura, ad esempio può utilizzare come parametro di controllo un cambio di pH oppure la quantità di O₂ disciolto.

La reazione biocatalitica produce un cambiamento misurabile nelle caratteristiche del brodo di coltura, questo cambiamento è misurato e quindi è trasformato in un segnale di output dal trasduttore.

Il biosensore funziona parametrizzando l'effetto della reazione di crescita di organismi su un parametro che misuriamo e che abbiamo calibrato come caratteristico dell'andamento della reazione.

I trasduttori sono generalmente dispositivi amperometrici e potenziometrici. Tali trasduttori sono inclusi nelle sonde di ossigeno disciolto e negli elettrodi pH, negli elettrodi ione-selettivi e nei dispositivi di rilevamento del gas.

Queste misure non sono fatte in linea ma vengono prelevati dei campioni e mandati a dei sistemi di analisi sequenziali, sono dei sistemi di campionamento automatico che possono avere anche delle frequenze di campionamento elevate → riusciamo a monitorare le condizioni di crescita e di avanzamento degli organismi.

STERILIZZAZIONE

Asepsi: stato di essere esenti o di stare al di sotto di un certo livello da contaminanti biologici.

Disinfezione: eliminazione dei microrganismi patogeni (escluse le spore). La presenza di microrganismi non patogeni può essere tollerata. Quindi sistema disinfettato è diverso da sistema asettico.

Sterilizzazione: processo che elimina o riduce i microrganismi dannosi.

La sterilizzazione della corrente di un processo di fermentazione (substrato e nutrienti) e l'aria è necessaria per eliminare la presenza dei microrganismi che non vogliamo crescere e di tutti i virus.

Deve essere effettuata prima dell'inoculazione del microrganismo.

Il grado di sterilizzazione è misurato dalla probabilità di permanenza della contaminazione e dalla natura delle conseguenze che questa contaminazione può avere.

I substrati di fermentazioni sono quasi sempre sterilizzati con vapore. La sterilizzazione con vapore umido è più efficace di quella con vapore secco. La sterilizzazione del vapore umido è fatta principalmente a 121 °C per 15 min.

Gli organismi non sono immediatamente eliminati ma la loro numerosità decresce esponenzialmente nel tempo.

Quello che si può avere in assenza di sterilizzazione è una resa più bassa, contaminazione del prodotto o degradazione del prodotto a causa dei contaminanti (che possono produrre enzimi o tossine).

La presenza di contaminanti è normalmente presente in aria, acqua, corrente di alimentazione, cibi e piante.

La conoscenza delle proprietà (in particolare la T di inattivazione) di questi organismi è utile per progettare la loro eliminazione.

Per evitare contaminazione bisogna usare un inoculo che abbia una sola tipologia di batteri, sterilizzare il substrato, unità di fermentazione, correnti di fermentazione e mantenere le cond asettiche durante tutto il processo.

Aspetti da considerare nel design di un protocollo da sterilizzazione: tipo, dimensione e composizione della popolazione contaminante, materiali del reattore, conc degli agenti contaminanti che determina l'intensità del trattamento, tempo di esposizione necessario all'agente sterilizzante.

Bisogna conoscere tutte le possibili sorgenti di contaminazione, sterilizzazione fatta spesso attraverso l'uso di T (che deve abbassare/ridurre la quantità dei contaminanti ma non alterare la natura del substrato).

Bisogna conoscere cond del brodo di coltura, V del reattore, tempi che possiamo permetterci come tempi morti, livello di contaminazione accettabile, procedure di valutazione e verifica, metodi di determinazione per provare l'avvenuta sterilizzazione.

Le operazioni di sterilizzazione portano a distruggere tutte le cariche contaminanti che possono essere presenti in una parte del sistema di reazione e che possono venire a contatto con il fluido di processo e assicurare che nessuno microbo entri dopo che le apparecchiature sono state sterilizzate.

Tutte le correnti che sono alimentate devono essere sterilizzate (aria, antischioma, sistemi di misura).

Bisogna assicurare che non vi siano vie di accesso alla contaminazione quindi tutte le vie devono essere chiuse.

Questo requisito significa avere una barriera sterile quindi il fermentatore e tutti i suoi bocchelli devono essere sterilizzabili. I gas in ingresso e tutti gli additivi devono essere sterilizzati prima di entrare nel reattore e tutti i bocchelli e anche le tenute dell'albero di motore devono essere sterilizzate.

Una prima classificazione differenzia i metodi fisici (calore, radiazione e filtrazione) dai metodi chimici (uso di agenti

antimicrobici) di sterilizzazione.

La morte di colonie di batteri comporta la denaturazione delle proteine, distruzione delle membrane cellulari e il danneggiamento del DNA.

Una classificazione diversa raggruppa i metodi in funzione della presenza di fasi diverse.

Una sterilizzazione attraverso radiazioni, ultrasuoni, agenti chimici e calore fa morire i microrganismi ma non li separa invece la filtrazione separa i microrganismi ma non li uccide.

Nell'industria farmaceutica la sterilizzazione con il calore è il metodo più comune per i substrati liquidi mentre per l'aria si preferisce la filtrazione (perché il coefficiente di scambio termico dell'aria molto basso quindi sarebbe inefficace con il calore).

La sterilizzazione a secco è meno efficace di quella a vapore umido.

In presenza di acqua sono necessari tempi di permanenza più corti per avere risultati simili.

Bisogna ridurre il n° di contaminanti nel tempo, la riduzione è esponenziale.

La cinetica di morte è una cinetica di primo ordine. La costante di velocità K è funzione delle cond di processo ma in particolare è in funzione della T (dipendenza che segue legge Arrhenius).

L'energia di attivazione di morte è elevata. Quindi l'aumento di T aumenta la velocità di sterilizzazione.

La morte degli organismi viene trattata come una reazione di primo ordine e di conseguenza si ha che il logaritmo del rapporto tra il n° di microrganismi iniziali e quelli finali è proporzionale a $k \cdot t$.

Se sono note k e energia di attivazione sappiamo qual è la velocità di reazione in qualsiasi altra condizione.

In alternativa si misura la velocità di morte a due T diverse, ricaviamo l'energia di attivazione con eq di Arrhenius e a questo punto estrapoliamo con una T diversa.

Spesso al posto della costante k si usa il **tempo di riduzione decimale (D)** ossia il tempo necessario per ridurre di un ordine di grandezza il numero di organismi alla T di esercizio. Generalmente a $T > 121^\circ\text{C}$ la D va da 1 ai 3 min.

Tanto D è più piccolo e tanto gli organismi muoiono più velocemente.

Oltre al valore di D un altro valore empirico utilizzato è il valore Z che descrive l'influenza della T nella reazione di attivazione dei microrganismi. Z è definito come l'aumento di T che causa riduzione di D di un ordine di grandezza.

È una funzione ed è legata all'energia di attivazione. Il valore di Z per la maggior parte dei batteri è circa 5° .

Il fattore di inattivazione è definito come $10^{(t/D)}$, è il tempo necessario per eliminare una colonia di batteri a una specifica T.

La riduzione della carica batterica è in funzione della T.

Nel caso delle spore frequentemente si può avere un'anomalia di questo comportamento cioè per brevi tempi la distruzione delle colonie è ridotta o addirittura per alcuni casi si osserva un aumento del n° per poi passare alla regione di distruzione; è dovuto al fenomeno di attivazione delle spore dormienti (la T attiva le spore e soltanto in seguito la T causa la morte delle colonie di spore).

Vengono definiti dei criteri di sterilità per confrontare l'efficacia di metodi diversi di sterilizzazione.

Un parametro è il **Del Factor (∇)** che è il ln del rapporto tra il n° di microrganismi iniziali e il n° di microrganismi al tempo t. Il tempo di sterilizzazione è ∇ / k . ($\nabla = \text{nabla}$)

Questo parametro misura la decrescita del n° di microrganismi vivi a una certa T e ad un certo tempo.

Più è alto il del-factor e più forte è la sterilizzazione.

Nel caso in cui io abbia un processo di sterilizzazione che prevede un susseguirsi di T diverse il processo avrà la somma dei del-factor. L'efficacia globale del processo è data dalla somma delle 3 fasi messe assieme: riscaldamento, mantenimento e raffreddamento.

La fase di riscaldamento è più veloce di quella di raffreddamento, questo perché abbiamo un ΔT maggiore e un coeff di scambio termico maggiore nel riscaldamento che nel raffreddamento.

Il tempo complessivo dell'operazione è determinato principalmente dalle fasi di riscaldamento e raffreddamento.

Il sistema di scambio termico può essere progettato sulla potenza termica da scambiare durante la sterilizzazione per accorciare i tempi della sterilizzazione stessa.

La descrizione cinetica del processo permette di scegliere i protocolli più adatti per effettuare il processo di sterilizzazione.

Deciso il valore di carica batterica tollerabile alla fine del processo di sterilizzazione dalle norme da seguire e nota la carica batterica iniziale si progetta il processo di sterilizzazione in modo tale che il livello di sterilità venga raggiunto.

Parametri che influenzano lo scambio termico: tipo e specie del microrganismo, natura delle cellule, età, numero e le caratteristiche chimico-fisiche dell'ambiente.

La sterilizzazione può essere effettuata in condizioni secche o umide, sotto P, in condizioni batch o cond continue ma il requisito è sempre quello di raggiungere l'effetto di sterilità fissato e minimizzare la denaturazione del substrato.

Si può effettuare il saggio su fiamma per distruggere gli organismi. Efficacia molto alta ma applicazioni ridotte perché le attrezzature che possono essere sterilizzate in questo modo sono limitate ai piccoli oggetti di laboratorio metallici oppure alla distruzione dei componenti tessili o della carta contaminata.

La bollitura viene fatta a 100°C per 30 min, i microrganismi sono distrutti a parte alcune endospore. Per uccidere le endospore e sterilizzare il substrato è richiesto di far bollire per più tempo e ripetutamente.

Nella sterilizzazione a batch si riempie prima il reattore con il substrato e i nutrienti, poi la miscela viene riscaldata alla T di sterilizzazione (120-140°C) e la T è mantenuta costante fino a quando non abbiamo raggiunto il livello di sterilizzazione richiesto e infine il substrato sterilizzato viene raffreddato fino alla T di fermentazione.

Solo dopo aver fatto ciò si può inoculare il reattore con il microrganismo.

Nelle sterilizzazioni dei reattori continui invece il substrato che viene alimentato al reattore è sterilizzato passando in uno scambiatore di calore e viene sterilizzato preriscaldandosi contro del substrato che è già stato sterilizzato e passando poi su del vapore.

La sterilizzazione può essere eseguita in modalità batch o in modalità continua con riscaldamento indiretto o per iniezione di vapore. Tutte e 4 le possibilità sono applicate industrialmente. È preferibile utilizzare vapore saturo in modo che una diminuzione della T provochi il trasferimento di calore latente di condensazione.

Se si ha del substrato concentrato è possibile sterilizzarlo per iniezione diretta di vapore (operazione più rapida e semplice). Avviene nel seguente modo: si ha il materiale non sterile che viene preriscaldato dal substrato già sterilizzato, viene iniettato del vapore, viene mantenuto in T in un serpentino poi attraverso una valvola di laminazione entra in una camera di espansione dove si raffredda, preriscalda il substrato in ingresso. C'è un ultimo scambiatore di calore per portarlo alla T di esercizio ed entra nel reattore.

Se non è possibile iniettare direttamente il vapore nel substrato utilizzeremo direttamente uno scambiatore di calore

A 121°C la P di vapore è 1 atm e in queste cond i batteri vengono inattivati in 5 min mentre le spore in 10 min circa.

L'efficacia è molto alta e vengono sterilizzati in un autoclave al cui interno viene iniettato del vapore degli oggetti con substrati di cultura che non devono contenere delle sostanze sensibili a quelle T.

È un modo di sterilizzare adatto praticamente a tutto tranne a quelle sostanze che sarebbero denaturate a quelle T.

Se abbiamo sostanze termolabili aumentiamo la T di sterilizzazione riducendo il tempo di sterilizzazione e così limitiamo la denaturazione e distruzione del nutriente.

Il calore secco richiede tempi più lunghi e T più alte rispetto all'autoclave perché l'aria non è un buon conduttore termico. Vengono sterilizzati in questo modo oggetti di vetro e materiali anidri che sarebbero danneggiati dal contatto con umidità (es. polveri).

Continuo vs batch

La sterilizzazione in continuo è più flessibile e più rapida, è un'unità separata rispetto al reattore e non deve necessariamente essere integrata in un'unica apparecchiatura con il bioreattore; permette un'esposizione al calore più corta quindi con meno danneggiamento del substrato. Apparecchiatura più facile per fare lo scale-up.

È possibile sterilizzare un substrato più concentrato di quello utilizzato nella reazione.

Si possono avere sistemi di recupero di calore e quindi avere un recupero del 70-80% del calore fornito al substrato, questo ci consente di avere un generatore di vapore con dimensioni più piccoli e produttività maggiore.

Tempi più corti perché non abbiamo fasi di riscaldamento e raffreddamento del reattore.

Quindi i vantaggi di un processo continuo sono: tempi più brevi per il ciclo di sterilizzazione, facile scale-up, meno danni al substrato e uso più efficiente degli impianti

I vantaggi del processo batch invece sono che abbiamo un'apparecchiatura in meno e quindi costi minori, abbiamo anche rischio di contaminazione più basso perché abbiamo meno trasferimento di fluido.

Sterilizzazione continua

I vantaggi della iniezione diretta di vapore sono: maggiore efficienza nell'uso di vapore, meno costi di investimento

(non abbiamo lo scambiatore di calore) ed è un sistema più facile come manutenzione e come pulizia.
Abbiamo dei cicli di raffreddamento/riscaldamento più brevi.
Lo svantaggio è possibile schiumeggiamento, bisogna utilizzare poi del vapore sterile.
Gli scambiatori a piatti (alternativa all'iniezione diretta di vapore) hanno dei tempi di riscaldamento/raffreddamento più lunghi.

Il processo di sterilizzazione applicato agli alimenti viene chiamato **pastorizzazione**.

La pastorizzazione non vuole eliminare tutti i microrganismi presenti negli alimenti, l'obiettivo è diminuirne il numero in maniera tale che per un certo periodo di tempo non possano sviluppare effetti patogeni.

Lo scopo primario della pastorizzazione era eliminare i microrganismi patogeni nel latte, nel tempo ci si è resi conto che questo processo aumentava anche il tempo di mantenimento del latte stesso.

Svantaggio: può alterare il gusto e la qualità, viene utilizzato principalmente per latte, vino, birra e succhi di frutta.

La pastorizzazione dei fluidi viene effettuata normalmente in scambiatori a piastre (hanno un'elevata sup di scambio per unità di volume e un alto coeff di scambio termico).

Il flusso del fluido riscaldante è in controcorrente con il fluido da sterilizzare.

Si può effettuare la pastorizzazione bassa: T di 60-65°C per 30 min con modalità batch, usato per birra e vino.

Poi vi è la pastorizzazione alta: T di 75-85°C in 10-15 secondi, applicato principalmente al latte.

È rimpiazzata adesso dalla pastorizzazione ad ultra T (**UHT**) che avviene a 120-135°C per 2-3 secondi, questo processo permette un tempo di conservazione maggiore del prodotto mantenendo più del 90% delle proprietà organolettiche e nutrizionali del prodotto.

Un aumento di T influenza maggiormente il processo di riduzione della carica batterica rispetto alla degradazione e denaturazione dei nutrienti.

È un trattamento che ha lo scopo di sterilizzare il latte; è soprattutto utilizzato per il latte usato per consumo diretto e non tanto al latte destinato ad ulteriori trasformazioni.

Anche il processo UHT può seguire le due tecnologie di scambio termico: trasferimento di Q indiretto (135°C per 2-5 s) o diretto (nella quale il vapore è iniettato direttamente e poi separato dal latte).

In tutti i casi l'obiettivo è quello di ridurre la carica batterica e quindi aumentare il tempo di vita del latte.

Il tempo legale di vita del latte a lunga conservazione è 3 mesi, un tempo maggiore aumenta le possibilità di alterazioni biochimiche.

Per aumentare la cinetica di sterilizzazione è necessario operare a $T > 120^{\circ}\text{C}$, questo è in funzione degli alti valori di energia di attivazione per le reazioni di deattivazione dei microrganismi e delle spore.

La scelta della T ha conseguenze sulla degradazione del substrato termico che avviene attraverso reazioni con un E_{att} dell'ordine di 20-40 kcal/mol, queste E_{att} sono inferiori a quelle delle reazioni di disattivazione dei microrganismi.

Pertanto, all'aumentare della T, la velocità di disattivazione del microorganismo aumenta più della degradazione del substrato, poiché il primo ha un'energia di attivazione maggiore. A parità di attività di sterilizzazione, la degradazione del substrato è minore quando si utilizzano temperature più elevate

STERILIZZAZIONE DELL'ARIA

Applicare la stessa tipologia di processo (usando quindi condensatori) alla sterilizzazione dell'aria è antieconomico perché dovremmo usare aree di superfici di scambio molto grandi.

Normalmente l'aria viene sterilizzata per filtrazione su filtri fatte di fibre di vetro, materiali sinterizzati o di membrane che devono essere secche per un funzionamento corretto.

Un'unità di filtrazione è sufficiente se ben progettata senza necessità di ulteriore riscaldamento.

I filtri stessi devono essere preventivamente sterilizzati, per vapore o con metodi chimici quindi per esempio ossido di etilene, e essiccati a 50°C. I filtri assoluti (HEPA → High Efficiency Particulate Air filters) sono fatti da membrane in esteri cellulose o nylon con porosità inferiore a 0.5 μm .

Questi possono separare tutti i batteri fino a quelli più piccoli ma non i virus. Normalmente viene messo un pre-filtro a monte del filtro per separare il particolato più grosso e quindi allungare la vita alla membrana.

L'uscita dell'aria è satura di vapore d'acqua e trasporta degli aerosol.

Questa aria in uscita viene asciugata attraverso una condensazione o semplicemente attraverso un surriscaldamento e viene filtrata in modo tale da separare gli aerosol che contengono gli organismi (bisogna sempre confinare il contenuto

del bioreattore → posizionare un filtro sulla corrente d'aria d'uscita).

Nel caso di processi di smaltimento di rifiuti la corrente d'uscita può contenere sostanze organiche, questi prodotti organici possono essere eliminati grazie alla combustione (che avviene a 400°C) ma se dobbiamo eliminare anche odori dobbiamo andare a 900° C oppure lavare la corrente d'uscita con delle soluzioni ossidanti (come formaldeide). I componenti più piccoli vengono separati per ultrafiltrazione (come ad esempio l'emoglobina).

Con gli ioni passiamo ad osmosi inversa.

I filtri dell'aria in ingresso sono di: lana di vetro (filtro a spessore in cui il particolato viene trattenuto a causa della diversa inerzia di particelle rispetto alla corrente di gas quindi per impatto delle particelle sulle fibre queste vengono trattenute) o di membrana di acetato di cellulosa o di policarbonato (filtro in cui la separazione avviene per effetto della dimensione della porosità della membrana).

I **filtri a spessore** hanno un livello di saturazione oltre il quale non filtrano più e non trattengono più il materiale. Intrappolano gli organismi nella matrice del filtro, possono operare su una separazione per dimensione o per elettrostatica (nel caso in cui vengano caricati con una differenza di potenziale).

Filtri normalmente usati per i gas, trattengono le particelle con dimensioni di 0.3 µm con un'efficienza superiore al 99.97%, usati per correnti d'uscita dalle unità di fermentazione o per filtrare i gas in alimentazione alla coltura di cellule in crescita. Efficaci per tutti i microrganismi. Sono fatti normalmente con fibre di vetro.

I **filtri a membrana** invece sono fatti di esteri cellulose, nylon, polisolfone, policarbonato ecc. operano per taglio dimensionale, non vengono mai saturati → non c'è mai rischio di eccedere la capacità del filtro.

I diametri dei pori sono normalmente di 0.2 µm per sterilizzare i liquidi ma possono arrivare anche fino a 0.02 per eliminare i virus dalle correnti gassose. Sono usati anche per i gas (aria o CO₂).

Esistono altri modi di sterilizzazione, come con le **radiazioni non ionizzanti** (es. lampade UV).

La loro azione germicida è legata al fatto che i raggi UV inducono mutazioni negli acidi nucleici (specialmente nel DNA), efficacia molto alta ma sono radiazioni non penetranti e quindi limitate alla superficie esposta.

Usati per la sterilizzazione dell'aria, potabilizzazione dell'acqua e per la sterilizzazione delle superfici (laboratori, camere operatorie)

Oppure si usano **radiazioni ionizzanti** come i raggi gamma, queste causano modifiche negli acidi nucleici sia direttamente che attraverso i radicali dell'ossigeno che vengono prodotti.

Efficacia molto alta, sono radiazioni penetranti ma costo molto alto.

Applicazioni per alimenti e per attrezzature di plastica (siringhe, cateteri, pipette, piatti ecc).

Sterilizzazione via chimica quindi con agenti ossidanti:

1) Ossido di etilene, molto attivo contro microrganismi e spore. Reagisce con tutti i gruppi attivi (COOH, NH₂, OH) bloccando l'attività enzimatica. Efficacia molto alta, usata nelle applicazioni mediche e chirurgiche, specialmente su tutti gli strumenti che non sopportano T alte come gli endoscopi.

Va fatto con opportune cautele perché è un gas irritante molto esplosivo.

2) Formaldeide

3) Gluteraldeide

Agenti anti-microbici

Antisettici: agenti che sono sufficientemente delicati da poter essere applicati sulla pelle e mucose, sono basati su composti di mercurio, nitrato di argento, alcol e detergenti.

Disinfettanti: eliminano i microrganismi ma non le spore. Non possono essere usati su tessuti viventi e sono ad esempio candeggina, composti clorati e solfato di rame.

Agenti preservanti: inibiscono la crescita dei microrganismi nei cibi. Non devono essere tossici all'ingestione, es. solfiti dei vini.

I fattori che influenzano la scelta dell'agente anti microbico sono: natura e conc dei microrganismi, l'efficacia, i meccanismi di azione, tossicità, allergenicità e le condizioni di utilizzo.

Gli **antibiotici** sono agenti antimicrobici prodotti dai microrganismi che uccidono o inibiscono la crescita di diversi microrganismi. Una definizione più ampia include qualsiasi prodotto naturale che può uccidere inibire la crescita di differenti cellule.

La disinfezione serve a eliminare gli agenti patogeni capaci di causare infezione o malattie.

Elimina la carica batterica patogena. La disinfezione può essere effettuata tramite metodi fisici come il calore (a T più basse e tempi più corti rispetto a quelli della sterilizzazione) oppure con agenti chimici quindi utilizzando sostanze ossidanti, alogeni, saponi, detergenti sintetici e fenoli.

I virus sono i più facilmente disinfettabili mentre le spore sono quelli più difficilmente disinfettabili.

DETTAGLI DELLA STERILIZZAZIONE

L'efficacia di una sterilizzazione viene definita sulla base di riduzione della carica dei microrganismi e con un criterio probabilistico, in particolare con lo sterility assurance level (SAL), questo numero esprime la probabilità che una singola operazione di sterilizzazione non arrivi a ridurre la carica batterica al livello prefissato.

Per esempio se un metodo di sterilizzazione ha un SAL di 10^{-3} significa che c'è 1 possibilità su 1000 che un organismo sopravviva al processo di sterilizzazione.

Bisogna fissare un livello di probabilità massimo di non successo dell'operazione di sterilizzazione.

Quello che è misurato dal SAL non è lo stesso della riduzione della carica dei microrganismi che viene determinata sulla base di un'eq cinetica ed è una quantità deterministica.

Infatti mentre il SAL misura la probabilità che gli organismi sopravvivano al processo di sterilizzazione, le misurazioni di riduzione logaritmica mostrano la quantità o la percentuale di microbi vivi eliminati dopo la sterilizzazione.

In modo semplificato i due concetti però vengono fatti coincidere, si accetta di calcolare il SAL sulla base del criterio deterministico della riduzione della carica dei microrganismi (perché è più facile avendo delle eq cinetiche).

Si assume in modo semplificato che la probabilità espressa dal SAL sia il doppio della riduzione logaritmica della carica microbica. Una riduzione di 6 ordini di grandezza corrisponde quindi ad esempio ad un SAL di 10^{-3} .

Il valore di D esprime la reazione cinetica alla T di esercizio della sterilizzazione, D è una funzione della T (perché la costante cinetica segue la legge di Arrhenius). Z esprime la sensibilità di D al variare della T \rightarrow Z è l'incremento di T necessario per aumentare di un ordine di grandezza D.

Convenzionalmente si assume che il valore di Z per un processo di sterilizzazione a secco sia 20°C mentre con vapore condensante 10° C.

Il lethality rate (F), F_H per sterilizzazione a secco e F_0 con vapore condensante, esprime il tempo equivalente che produce la stessa riduzione della carica microbica alla T di riferimento (T_b) ; questa T, ancora in maniera convenzionale, è definita a 170°C per la sterilizzazione a secco e a 121°C per vapore condensante. $F=10^{((T-T_b)/Z)}$.

L'utilità di F è che se abbiamo un processo complesso, costituito da fase di raffreddamento, riscaldamento e mantenimento, ha come effetto una riduzione della carica dei microrganismi che è uguale alla somma dei lethality rate di ciascun processo. Avendo il lethality rate si può poi determinare il grado di riduzione della carica microbica per il processo e per i microrganismi analizzati.

Il valore di F_0 è utile nella progettazione di un processo di sterilizzazione perché ci dà una relazione tra l'efficacia del processo e la riduzione di carica batterica del mezzo di reazione ed è quello che ci permette di andare a misurare la riduzione logaritmica della carica batterica e quindi di poter ricavare il SAL che è quello richiesto dalle specifiche della progettazione. Per profili di T vari F_0 può essere sommato nei diversi tratti.

L'utilizzo di vapore saturo e quindi vapore condensante è più efficace del vapore secco perché il cambiamento di stato (condensazione del vapore) determina un maggiore coefficiente di scambio termico e quindi ho la massima quantità di calore trasferito agli oggetti da sterilizzare.

Durante la sterilizzazione il calore latente viene rilasciato nella camera dell'autoclave, la condensazione del vapore determina una diminuzione del volume che richiama altro vapore all'interno della camera. Quindi sterilizzazione più efficace.

Il vapore secco può essere o vapore surriscaldato con il quale scaldiamo a T più elevate che non con il vapore condensante ma abbiamo trasferimento di calore meno efficace oppure possiamo avere mix con gas non condensanti (quindi mix con aria, azoto, CO₂ ecc) che determinano T più basse e P più elevate.

Un processo di sterilizzazione deve essere validato.

Per farlo bisogna andare a misurare l'effettiva carica batterica prima o dopo l'operazione, è un processo lungo e difficile da eseguire anche perché bisogna determinare le possibili sorgenti di inquinamento del sistema.

Per la validazione di un processo di sterilizzazione a seconda del tipo di materiale da sterilizzare abbiamo diversi approcci:

- 1) per i materiali sensibili alla T bisogna operare la sterilizzazione alla T minima efficace, approccio di Bioburden ossia andiamo a misurare la conc microbica presente effettivamente nel sistema e si ricavano le cond di tempo e le T minime necessarie per effettuare la riduzione della conc al livello prefissato.
- 2) sistemi misti in cui non si va a misurare la carica batterica ma abbiamo un sistema di bioindicatori (e questi misurano l'efficacia dell'operazione di sterilizzazione). Approccio combinato.

Gli *indicatori biologici* sono preparazioni standardizzate di microrganismi specifici che sono resistenti ad un particolare processo di sterilizzazione, sono sistemi standard utilizzati per la validazione.

Sono sotto forma di: strisce inoculate di spore introdotte in contenitori di vetro; ampole riempite con sospensione di spore e soluzioni di spore in sospensione di etanolo o acqua usate per l'inoculazione diretta delle superfici.

- 3) per materiali resistenti e stabili alla T si usa un approccio overkill, si utilizzano dei valori di D e Z tabulati per assicurare che il nostro processo di sterilizzazione sia stato efficace. Approccio conservativo.

DIFFERENZA TRA GLI APPROCCI: sta nella quantità di lavoro sperimentale per calcolare il valore di letalità (F) richiesto.

Per l'approccio Bioburden e per quello combinato avremo valori di F tarati sul sistema e quindi più bassi mentre nell'approccio overkill si assumono valori di F più elevati e quindi sterilizzazione più drastica.

DOWNSTREAM

Operazioni per separare e purificare i prodotti ottenuti dai processi biologici.

Sistemi solitamente con composizioni chimiche complesse e indefinite.

Bisogna separare solidi sospesi in liquidi che hanno delle dimensioni normalmente molto piccole.

Bisogna separare solidi da liquidi o liquidi da liquidi che hanno caratteristiche simili in termini di densità specifica; le particelle sospese hanno forma variabile e le cellule possono essere sferiche oppure possono essere filamentose.

L'energia necessaria per rompere la membrana cellulare può essere molto diversa. L'idrofilità del prodotto da recuperare è normalmente alta e quindi le cellule idrofiliche sono più difficile da aggregare.

Tutto ciò tenendo conto della tossicità dei mezzi di reazione.

È necessario mantenere operazioni di contenimento anche nel downstream.

I prodotti in generale sono presenti in concentrazioni molto basse, possono essere termolabili, essere sensibili alle cond di processo (pH e forza ionica) e essere presenti con impurezze.

Bisogna rispettare i requisiti di qualità del prodotto finito desiderato.

Al diminuire delle dimensioni delle particelle aumentano i costi di separazione.

In ciascun metodo di separazione abbiamo perdite di prodotto legate all'operazione → necessario ridurre il n° di step e aumentare la capacità di recupero di ogni step. Tanto più è difficile separare e tanto più l'operazione sarà costosa.

Non ci sono delle regole teoriche consolidate per effettuare il processo di purificazione, ci si basa sull'esperienza e su delle regole di buon senso.

Alcune regole empiriche sono: il separare prima le impurezze presenti in maggiori quantità e quelle più facili da rimuovere, per ultime invece si separano le impurezze più difficili in maniera tale da trattare minori volumi di corrente di processo. I processi che vengono scelti sono poi quelli per i quali la differenza della forza motrice di separazione è massima per la nostra corrente di processo e per ottimizzare la separazione si effettuano delle operazioni di separazioni basate su forze motrici diverse (per ottimizzare la purezza del prodotto).

Quindi inizialmente isoliamo il prodotto che vogliamo recuperare, facciamo operazioni di concentrazione e stabilizzazione del prodotto poi rimuoviamo le impurezze presenti in grandi quantità e infine effettuiamo la purificazione per ottenere la purezza richiesta dalla rimozione delle impurezze presenti in traccia.

Quindi prima tecniche di separazione a bassa risoluzione e alta capacità di trattamento (come precipitazione, centrifugazione, filtrazione ecc) seguite da purificazioni con migliore risoluzione ma bassa capacità di trattamento (ultra centrifugazione, adsorbimento ecc).

Esistono anche operazioni che hanno alta risoluzione e alta capacità di trattamento come l'ultra filtrazione, cromatografia su membrana e cromatografia sul letto fluido.

Quindi lo scopo è quello di trovare il processo più veloce per ottenere il prodotto finale con purezza richiesta, bisogna minimizzare la manipolazione del campione, gli step da effettuare e utilizzare differenti tecniche (quindi forze motrici diverse) per separare impurezze di tipo diverso. Ogni tecnica offre un bilanciamento diverso tra risoluzione della separazione, velocità, efficacia e la resa dell'operazione.

Esempi di operazioni unitarie: prima operazioni di separazione, se quello che vogliamo ottenere è un metabolita intracellulare bisogna rompere la membrana cellulare tramite metodi fisici, chimici o biologici, a questo punto bisogna effettuare la purificazione del prodotto con risoluzione medio bassa poi si effettua la purificazione ad alta risoluzione e infine, se vogliamo il prodotto sotto forma di solido, abbiamo operazioni di asciugatura.

Bisogna minimizzare la perdita di prodotto all'interno di ciascuna fase di operazione per esempio selezionando la procedura di estrazione in base alla fonte e alla posizione delle proteine

Bisogna cercare anche di utilizzare procedure delicate per ridurre al minimo l'acidificazione e il rilascio di enzimi, lavorare poco a T diverse dalla T amb, utilizzare sistemi di buffer per mantenere pH e forza ionica nei limiti che poi non denaturino il prodotto.

Importante massimizzare la resa di ciascun step e tenere quanto più possibile basso il n° di step.

Il processo di downstream può essere anche molto complesso, dipende se il prodotto è intracellulare (recuperare cellule, rompere membrana ed estrarre il prodotto) o extra cellulare (semplicemente rimuoviamo la biomassa e estraiamo il prodotto).

Se in queste operazioni abbiamo denaturato il prodotto dobbiamo rimaturarlo con operazione di soluzioni.

Per rompere la membrana cellulare si possono usare metodi fisici quindi presse, macinazione o ultrasuoni oppure con metodi chimici e/o biologici quindi con uso di detergenti, enzimi, solventi, conc ad alta salinità o con inibitori della parete cellulare. Altri metodi fisici sono: l'uso di mulini carichi di sfere, queste causano uno stress sulla sospensione delle cellule, garantiscono la rottura della membrana cellulare; centrifuga in cui si inietta la sospensione di cellule e si recupera il materiale cellulare frantumato alle pareti e il fluido di sospensione al centro della centrifuga.

Le presse servono ad aumentare la P del mezzo che viene assoggettato ad una rapida espansione che genera uno stress sufficiente a rompere la membrana cellulare; il flusso viene indirizzato su dei piatti bersaglio che causano la rottura.

PROCESSI DI SEPARAZIONE

Possono essere separazioni reattive o estrattive, il costo della separazione dipende dalle concentrazioni del prodotto nella massa reagente e dal livello di delicatezza per non denaturare il prodotto e il livello di purezza richiesta.

Possiamo operare in cond di equilibrio o non equilibrio.

La separazione può essere effettuata a stadi controcorrente, equicorrente o correnti incrociate.

I parametri da considerare sono forma, dimensione, carica, polarità, solubilità, volatilità e mobilità dei prodotti.

SEPARAZIONE DEI SOLIDI

È un'operazione difficile perché c'è una piccola differenza di densità tra i prodotti cellulari (presente in basse conc e con dimensioni piccole) e il mezzo di fermentazione, inoltre la reologia del mezzo è molto importante perché può complicare l'operazione e anche la compressibilità del solido introduce ulteriori complessità.

La separazione dei solidi si può effettuare tramite flottazione (facciamo galleggiare il prodotto solido e lo recuperiamo) o sedimentazione (prodotto solido si accumula alla base e come forza motrice ho l'accelerazione di gravità).

Dopo il processo di fermentazione le cellule sono leggere e generalmente hanno cariche superficiali, non c'è aggregazione o al massimo bassa aggregazione (per far avvenire la separazione bisogna forzare l'aggregazione per favorire la sedimentazione del materiale solido). Modifichiamo il pH, aggiungiamo dei coagulanti (sali inorganici o polimeri elettroliti) o dei flocculanti che effettuano un cross linking tra le diverse superfici.

La **filtrazione** è resa difficile dall'incompressibilità delle cellule e dalle caratteristiche non newtoniane del mezzo di prodotto di reazione. Durante la filtrazione a causa della sua incompressibilità l'aumento di P può causare una diminuzione della velocità di filtrazione a causa della porosità della torta di filtrazione.

Tanto più piccole sono le dimensioni delle particelle che vogliamo separare e tanto più è costosa l'operazione.

Per dimensionare l'operazione di filtrazione dobbiamo stimarne la velocità ovvero la velocità con cui viene raccolto il filtrato liquido.

Alcune considerazioni: 1) per una certa differenza di P la velocità di filtrazione è più alta all'inizio dell'operazione: ho meno resistenza prima della formazione di deposito 2) l'orientazione delle particelle nella torta di filtrazione può influenzare la struttura e la permeabilità del letto di filtrazione 3) una P eccessiva all'inizio del processo può causare l'otturazione del filtro e quindi delle resistenze alla filtrazione molto elevate 4) la resistenza del filtro può essere considerata costante soltanto se le particelle da filtrare non permeano nella membrana 5) la resistenza del letto

filtrazione aumenta all'aumentare dello spessore.

La velocità di filtrazione è direttamente proporzionale all'area filtrante e alla differenza di P a cavallo del filtro e inversamente proporzionale alla viscosità del fluido, resistenza specifica del letto di filtrazione, massa e resistenza della membrana di filtrazione → per aumentare velocità aumento A (sistemi più grandi sistemi costosi), aumento ΔP (per materiali compressibili può essere controproducente perché potremmo avere intasamento della membrana e diminuzione della porosità della torta di filtrazione), riduco la massa della torta riducendo il suo spessore (viene effettuato nella rotazione continua su tamburo perché viene ripulito il filtro ad ogni rotazione del tamburo) oppure ridurre viscosità del filtrato attraverso una diluizione.

I sistemi di filtrazione industriale sono due. Per i reattori batch abbiamo la *filtrpressa* in cui il materiale da filtrare è iniettato al centro della pressa e riempie le diverse camere, dopodiché viene applicata una P , il sistema viene compresso e il materiale viene filtrato sulle tele dei diversi piatti, in alcuni casi è possibile avere delle membrane che possiamo gonfiare con aria per schiacciare ulteriormente il pannello di filtrazione e spremere nuovamente il filtrato. Abbiamo il serbatoio di accumulo del materiale da filtrare, lo alimentiamo al filtrpressa, mandiamo in pressione il filtrpressa e recuperiamo il filtrato.

A operazione terminata apriamo il filtrpressa, laviamo i pannelli e li recuperiamo.

L'operazione continua invece è effettuata su *tamburi filtranti*, tamburi alla cui superficie viene posizionata la tela filtrante e che sono parzialmente immersi nel materiale da filtrare; questi tamburi ruotano raccogliendo il materiale solido sulla loro superficie durante la fase di immersione poi la torta di filtrazione viene lavata, seccata e staccata dalla sup di filtrazione prima che questa rientri nel mezzo da filtrare.

La torta di filtrazione si forma durante la parte di sommersione quindi diventa via via sempre più spessa.

Con i tamburi abbiamo una rigenerazione continua della superficie filtrata (ottimo per le operazioni continue).

Per aumentare la superficie di filtrazione si possono utilizzare dischi ruotanti, il funzionamento è analogo: ho dei coltelli raschiatori su ciascun disco in modo da rigenerare la su filtrante prima della nuova immersione nel mezzo.

La **centrifugazione** ha come forza motrice una differenza di densità tra il mezzo sospendente e ciò che dobbiamo separare. Possiamo separare sia delle particelle dei componenti subcellulari che anche proteine e DNA.

I parametri che influenzano l'efficacia di quest'operazione sono la dimensione, forma, densità e viscosità del mezzo che dobbiamo filtrare.

Una centrifuga viene definita sul numero Z che è il rapporto tra l'accelerazione centrifuga e l'accelerazione di gravità, è una funzione del raggio della centrifuga e del quadrato della velocità angolare. La velocità di centrifugazione dipende dal diametro delle particelle, dall'accelerazione centrifuga, differenza di densità e la viscosità del mezzo.

Le centrifughe industriali hanno uno Z che varia da 300 a 16000 mentre per le scale da laboratorio arriva fino a 500000. L'alimentazione della centrifuga avviene sull'asse, recuperiamo il solido alle pareti e il liquido chiarificato viene estratto dal collo della centrifuga.

Le operazioni di centrifugazioni sono più costose della filtrazione ma sono anche più efficienti.

L'efficacia è peggiorata da un'elevata viscosità dello slurry. Il controllo della T all'interno della centrifuga è difficile, abbiamo rischio di danneggiare materiali termolabili → non utilizziamo materiali termolabili.

SEPARAZIONE DEI PRODOTTI

Per effettuare la **precipitazione** dobbiamo aggregare le particelle e favorirne la sedimentazione.

La precipitazione dipende dalla solubilità quindi dal pH e dalla forza ionica della soluzione.

Se abbiamo pH elevati la superficie della proteina è ossidrilata, la sup delle proteine è carica negativamente e tendono a respingersi per effetto elettrostatico; a pH basso le sup sono protonate quindi cariche positivamente e si respingono nuovamente non aggregandosi. In prossimità del punto isoelettrico (punto in cui carica potenziale superficiale = 0) non si ha effetto di repulsione elettrostatica, le diverse molecole possono avvicinarsi e interagire per effetto delle forze di Van der Waals e quindi aggregarsi tra di loro.

Quindi possiamo causare la precipitazione andando a modificare il pH (in prossimità del punto isoelettrico).

Anche la forza ionica influenza la precipitazione poiché la costante dielettrica del mezzo nel quale il sistema è disciolto diminuisce la distanza di interazione e quindi riduce le forze di dispersione e quindi all'aumentare della forza ionica la solubilità diminuisce.

Processi di **elettroforesi** in cui come forza motrice ho il campo elettrico. Il sistema è basato sulla carica, forme e proprietà del mezzo di separazione. Può essere effettuato in un mezzo liquido o in un gel.

L'**estrazione liquido liquido** riguarda il trasferimento di soluto da un liquido all'altro e dipende dal coefficiente di ripartizione del soluto nei due diversi solventi.

Viene utilizzato quando il soluto e il solvente hanno volatilità simile (non posso effettuare una distillazione), il soluto è termolabile, sol e solv formano miscele azeotropiche oppure quando la conc di soluto è bassa.

È usato per purificare gli antibiotici, prodotti naturali e coloranti.

I due solventi devono essere immiscibili tra di loro in modo da separarsi facilmente.

Tipicamente costituito da due fasi acquose o non acquose come acqua e acetone o acqua e cloroformio.

Possono essere anche sistemi immiscibili di due fasi acquose. Operazione effettuata con miscelazione e contattamento delle due fasi che poi vengono lasciate separare e vengono divise tra di loro; se i solventi sono completamente miscibili tra di loro non possono essere usati per l'estrazione, devono essere immiscibili o almeno parzialmente immiscibili.

La velocità dipende dal coefficiente di trasporto, superficie di scambio e dalla differenza di conc tra le due fasi.

Bisogna aumentare l'area di contatto quindi è utile agitare bene i due solventi per favorirne il contatto tra le due fasi, usiamo un sistema miscelato e dei sistemi con flusso controcorrente, sistemi agitati oppure facciamo contattare il sistema attraverso una struttura porosa.

Inizialmente il prodotto è contenuto tutto nella fase acquosa, la contattiamo con un solvente, inizialmente la conc di solvente è uguale a 0, dopo contattamento la conc del prodotto nel solvente è data dal coefficiente di ripartizione del prodotto nel soluto tra la fase acquosa e il solvente.

La coalescenza e la separazione delle fasi avviene per differenza di densità e possono essere favorite dalla forza centrifuga o dalla presenza di membrana.

Sostanzialmente abbiamo un recipiente agitato nel quale effettuiamo il contattamento che massimizza la sup di contatto e poi una zona di separazione, questo può avvenire in batch con equipaggiamento semplice ed è facile fare i conti di dimensionamento però per sistemi di larga scala non è pratico.

Si può usare lo stesso schema con un processo continuo quindi con alimentazione continua del mezzo da separare e poi un separatore continuo che può essere ad esempio a pacchi lamellari che facilita la coalescenza e la separazione delle due fasi. Il sistema può essere effettuato in controcorrente in modo tale da massimizzare in ciascun stadio la forza motrice che è data dalla differenza di concentrazione tra i due solventi.

Il processo può essere effettuato su colonna: a riempimento o a piatti perforati.

Si possono avere sistemi di agitazione per favorire la miscelazione dei fluidi oppure piatti perforati.

Un sistema diffuso è il contatore Podbielniak, una colonna a piatti perforati in cui la separazione tra i due solventi viene favorita dalla centrifugazione. È sostanzialmente un separatore che ruota attorno alla testa della colonna.

I liquidi vengono forzati nel loro movimento controcorrente attraverso delle separazioni, elevata sup di scambio, molto contatto tra i due liquidi. Fluido pesante introdotto assialmente mentre il fluido leggero tangenzialmente.

A causa della forza centrifuga e della differenza di densità, il liquido pesante viene spinto verso le pareti.

Quando il liquido pesante si propaga attraverso le perforazioni, sposta un uguale volume di liquido leggero verso l'albero. I due liquidi che scorrono in controcorrente sono costretti ad un contatto intenso.

Il liquido leggero viene raccolto all'albero e il liquido pesante viene raccolto sulle pareti.

Vantaggio: asse di rotazione orizzontale → migliore stabilità del sistema, supporta meglio i sbilanciamenti della centrifuga. Ha dimensioni ridotti e seppur il costo sia elevato è altamente efficiente nel ridurre i tempi di separazione.

Il sistema ha delle tenute meccaniche che facilità l'operazione ermetica ed è un sistema automatizzato che può essere condotto con una minima supervisione.

Può essere anche organizzato in maniera tale da semplificare la supervisione e la pulizia del sistema.

Esempio: estrazione liquido liquido della penicillina in una fase organica, dopo averlo fatto dobbiamo rinaturalarla in maniera tale da ripristinare l'efficacia del materiale e lo si fa utilizzando una soluzione di carbonato d'ammonio.

Ripristiniamo e riestraiamo la penicillina in questa situazione → abbiamo effettuato una conc di penicillina.

L'**evaporazione** non è adatta a prodotti termolabili per i quali bisogna ridurre il tempo di residenza e aumentare sup di scambio termico per ridurre le T necessarie. Utilizzata per la conc di succhi di frutta o delle puree vegetali nella forma di evaporatori su strato sottile, ci sono dei sistemi di agitazione che rinnovano lo strato sottile in maniera tale da evitare accumuli e degradazione termica del prodotto.

PURIFICAZIONE

Il metodo di purificazione dipende dal tipo di processo, se si usano larghi o piccoli V, tipo di materiale cellulare, concentrazione di prodotto nel brodo di cultura di fermentazione, forza motrice da utilizzare (dimensioni delle particelle, densità, differenze di affinità o solubilità).

Tanto più abbiamo delle soluzioni diluite, V piccoli e delle basse conc e tanto più i costi aumentano e l'influenza del downstream aumenta rispetto al costo del processo globale.

La facilità di effettuare l'operazione dipende dalle cond del brodo di cultura e in particolare dalla viscosità.

È anche importante la conc di prodotto nella corrente d'uscita dalla bioreazione. All'aumentare della diluizione del prodotto aumentano i costi di separazione e quindi aumenta il costo di vendita del materiale.

I processi di **purificazione su membrana** sono diffusi e avvengono separando il prodotto su una membrana che è una barriera sottile fatta di un materiale che consente il passaggio selettivo di specie diverse attraverso di essa.

Un processo a membrana è anche un processo a filtrazione, tuttavia un filtro può trattenere solo particelle sospese mentre una membrana può separare anche molecole/ioni disciolti in soluzione.

La selettività è dovuta alla forma, dimensione, carica elettrostatica, diffusività, interazioni fisico chimiche, volatilità e polarità/solubilità.

Le prestazioni invece dipendono da: resistenza a P, tanto più cerco di separare particelle di piccole dimensioni tanto maggiore è la P che devo esercitare, resistenza chimica al pH e ai solventi, permeabilità a ioni e molecole, porosità (capacità di trasferire il permeato) e proprietà elettriche (per fenomeni di filtrazione elettrostatica).

Schema di processo di filtrazione tangenziale: ho il flusso di materiale che scorre all'interno di un tubo, ho la membrana, i solidi si accumulano sulla superficie di questa e il permeato attraversa la membrana.

I parametri di processo che influenzano l'efficacia di questo modo di separazione sono: la differenza di P a cavallo della membrana, il gradiente di concentrazione, il potenziale chimico, la P osmotica, campo elettrico, campo magnetico, P parziale e il gradiente di pH.

Le membrane sono dei setti semi permeabili. Possono essere fatte a partire da materiali polimerici, ottenuti per precipitazione in fase vapore, precipitazione per evaporazione, precipitazione per immersione, per precipitazione termica o con altri metodi come stretching, sinterizzazione, slip casting o procedure di leaching.

Leaching significa avere una fibra di polimero, lo bombardo con una radiazione di ioni e poi effettuo una operazione di leaching in modo da ottenere nella membrana delle porosità a dimensione e densità controllate → controllo la permeabilità e diametro dei pori scegliendo il tipo di leaching dopo aver fatto bombardamento ionico della membrana.

Un processo di separazione a membrana viene utilizzato per: la concentrazione del prodotto cioè la rimozione del solvente, la chiarificazione cioè la rimozione di particelle da un fluido come sterilizzazione dove le particelle solide sono i microrganismi, rimozione di un soluto dal solvente come desalinizzazione, demineralizzazione, dialisi, operazione di frazionamento quindi separazione di un soluto da un altro soluto, operazione di separazione di gas da un altro o operazione di pervaporazione cioè rimozione delle frazioni volatili dalle frazioni non volatili.

I materiali delle membrane possono essere polimeri organici, i più utilizzati sono polisolfoni e cellulose (si scelgono in funzione della chimica dell'ambiente, la membrana deve essere resistente alle cond di processo) oppure possono esserci membrane inorganiche ottenute attraverso sinterizzazione delle polveri, allumina, vetro borosilicato, carbonio attivi ecc.

Le membrane possono essere isotropiche microporose, possono essere costituite da polimeri che hanno dei gruppi funzionali ionici e quindi sono membrane elettricamente cariche che servono a separare i prodotti in funzione della loro densità di carica, membrane asimmetriche in cui la porosità varia nello spessore della membrana oppure membrane liquide supportate in cui si ha una matrice polimerica i cui pori sono riempiti del liquido che effettua la separazione.

Il processo di filtrazione può essere dead end in cui facciamo percolare la sospensione attraverso una membrana filtrante e recuperiamo il filtrato da sotto altrimenti si possono effettuare operazioni cross flow nel quale abbiamo un tubo permeabile nella quale si fa passare la sospensione, si recupera l'estremità del tubo e il filtrato è recuperato all'esterno del tubo.

In funzione della larghezza dei pori quindi delle dimensioni del materiale da separare abbiamo diversi tipi di processi che sfruttano le membrane: abbiamo filtrazione convenzionale che arriva fino a qualche decina di μm , operazione di microfiltrazione che arrivano fino a separare particelle submicromiche, ultrafiltrazione che separa tutto ciò che è submicromico, nanofiltrazione e osmosi inversa che riescono a separare anche piccole molecole.

Microfiltrazione: la membrana simmetrica porosa è attraversata dal solvente, dai soluti di basso peso molecolare e dalle macromolecole e vengono trattenute soltanto le particelle nel campo 0.1-10 μm . Filtrazione che avviene per effetto delle dimensioni delle particelle da separare. Il ΔP a cavallo della membrana va da 0.1 a 5 bar.

La forza motrice è la differenza di P idrostatica.

Ultrafiltrazione: utilizzo di membrana asimmetrica microporosa con delle dimensioni delle porosità da 0.1 μm o meno e trattiene anche le macromolecole, fa passare soltanto il solvente e i soluti di basso peso molecolare.

È un filtro molecolare e la P di esercizio è dell'ordine delle 10 atm. La forza motrice è la differenza di P

Osmosi inversa: membrana asimmetrica con porosità ancora più piccola, trattiene anche i soluti di basso peso molecolare, è permeabile soltanto ai solventi. La ΔP è dell'ordine delle decine di atmosfere.

La dialisi è un processo che ha come forza motrice una differenza di concentrazione, si ha una membrana permeabile a soluto di basso peso molecolare. Si ha una separazione della corrente d'ingresso e il contattamento può essere effettuato in controcorrente o equicorrente. Con il controcorrente vantaggio di mantenere circa costante le forze motrici nei diversi stadi dell'apparecchio e quindi aumentare l'efficienza complessiva. Il meccanismo di separazione è una diffusione all'interno della membrana e separa sali e microsoluti da soluzione macromolecole.

Elettrodialisi: effettuata su una membrana a scambio anionico e cationico, la forza motrice è un gradiente di potenziale elettrico e i meccanismi di separazione sono meccanismi elettrochimici e dimensione delle particelle.

È utilizzato per fare dissalazione di soluzioni ioniche.

Separazione dei gas: effettuata su membrane asimmetriche, dense e omogenee, la forza motrice è il gradiente di P parziale, meccanismi di separazione sono una diversa solubilità e meccanismi di diffusione attraverso la membrana.

Confronto ultrafiltrazione vs centrifugazione: il costo per una filtrazione su membrana non è molto influente dalle dimensioni delle particelle da separare, queste definiscono il tipo di membrana da scegliere ma il costo dell'attrezzatura necessaria non è modificata da questo → ultrafiltrazione preferibile se necessario ottenere una corrente libera da solidi e per prodotti termolabili (nella centrifugazione la T è difficile da controllare).

La forma costruttiva dell'apparato che lavora su membrana può essere diversa a seconda dei dettagli costruttivi.

Si può avere delle membrane sotto forma di *fogli piani* attraverso cui facciamo scorrere il fluido. Il flusso è laminare o turbolento, a seconda della portata del fluido. Il rapporto tra l'area della membrana e il V dell'apparecchiatura è basso. Il coefficiente di trasporto è in generale basso perché non abbiamo molta turbolenza nel moto del fluido.

Vantaggio: materiale che può essere facilmente smontato e pulito.

Sistemi di membrane avvolte a *spirali* in cui aumentiamo il rapporto della sup filtrante e il V dell'apparato. Abbiamo fogli filtranti separati da sistemi di separazione che mantengono separate le membrane e permettono il passaggio di fluidi. Il fluido è fatto passare all'esterno e il permeato è raccolto all'interno dell'avvolgimento spirale della membrana. Sistemi su *fibre cave*, il flusso è laminare o turbolento, aumentiamo la sup di scambio per unità di V.

Siccome è aumentata la turbolenza del moto è migliore il coeff di scambio però il sistema non può essere smontato e pulito e quindi è suscettibile allo sporco o intasamento delle fibre.

Sistema *tubolare* nel quale il flusso è di tipo turbolento, il coeff di scambio è alto, basso rapporto A della membrana rispetto al V dell'apparecchiatura. Condizioni idrodinamiche facili e semplici da caratterizzare.

Sistema a *capillare*: abbiamo un sistema di contenimento, alimentiamo la soluzione e al centro si preleva il concentrato. È usato per operazione di ultrafiltrazione, pervaporazione e per membrane liquide.

Sistemi di *fibre cavi*: costa poco, funziona per osmosi inversa e separazione dei gas.

Si manda la soluzione nel mantello e si preleva il permeato dall'asse del sistema.

Sistemi *tubolari*: l'area disponibile è molto bassa (20-30 m^2/m^3), costo elevato. Applicazione cross-flow di mix che hanno alto contenuto di solido, sono sistemi che tenderebbero a bloccare i sistemi a capillare o sistemi di fibre cavi.

Sistemi a *piatti filtranti*: piatti sovrapposti che permettono sup più alta a scapito di una geometria più complessa e costo più elevato. Usati per filtrazione, pervaporazione, separazione dei gas e osmosi inversa.

Modulo di *membrana a spirale*: membrana avvolta su un tubo centrale, l'area disponibile è elevata, costo basso.

La membrana è separata nel suo avvolgimento da uno spaziatore. Il flusso passa nei canali delle membrane ed esce attraverso l'asse centrale. Viene applicato in ultrafiltrazione, osmosi inversa, separazione gas e pervaporazione.

Membrane *liquide* sono costituite da un film liquido su due fasi liquide. Abbiamo la corrente e la fase della membrana ed effettuiamo una prima emulsione della corrente che vogliamo separare con la fase della membrana, poi effettuiamo

seconda emulsione con fase di estrazione e a questo punto la separazione avviene per diffusione del prodotto dall'interno della corrente di ingresso nella membrana verso il solvente che effettua l'estrazione.

La doppia emulsione passa attraverso un sistema che rompe l'emulsione, i due fluidi vengono separati, il fluido della membrana viene ricircolato e fatto alimentare al sistema.

Trasporto del soluto avviene attraverso meccanismo di partizione-diffusione (partizione con il solvente e diffusione nella membrana liquida). Applicato alla separazione degli antibiotici.

Questo sistema di membrana liquida può essere anche realizzato attraverso un sistema di membrane supportate.

Abbiamo un setto polimerico le cui porosità sono riempiti dalla membrana semi permeabile che effettua la separazione. Meccanismo di partizione-diffusione.

I processi di **separazione cromatografica** sono processi dinamici basati sul trasferimento di massa tra due fasi diverse, le fasi coinvolte sono una fase stazionaria e una mobile.

La prima normalmente si trova sotto forma di un letto impaccato mentre la seconda è un fluido che fluisce sulla fase stazionaria, le sostanze contenute nella fase mobile sono trasportate dall'eluente e interagiscono in modo diverso con la fase stazionaria; si legano in maniera selettiva e reversibile sulla fase stazionaria per cui esiste una velocità di eluizione in funzione dell'affinità del soluto con la fase solida.

Tanto maggiore è l'affinità del soluto con la fase solida e tanto più è lenta la velocità di eluizione → questo permette la separazione dei componenti.

I tipi di processi sono di adsorbimento, scambio ionico, interazioni idrofobiche, interazioni di esclusione, un'estrazione con fluido supercritico o separazione per affinità.

Applicazioni più svariate, va dai materiali farmaceutici, trattamento acque a diagnostica.

Le sostanze che vogliamo separare sostanzialmente sono trasportate dalla fase mobile sul letto stazionario, queste sostanze hanno un'interazione selettiva con la fase stazionaria quindi la velocità di trasporto è funzione della natura di interazione.

L'adsorbente può essere un solido, liquido insolubile o un liquido non volatile trattenuto nei pori di un solido.

Il soluto si muove attraverso un separatore trasportato dalla corrente mobile di eluizione.

Noi abbiamo un letto fisso e una fase mobile che contiene due composti A e B che si muovono sul letto solido a velocità diverse perché hanno interazioni diverse e quindi vengono eluiti a tempi di ritenzione diversi, alla fine dopo l'eluizione del componente che ha maggior energia di interazione, la fase mobile viene rigenerata.

Tempo di ritenzione = tempo necessario alla sostanza di essere trascinata fuori dalla colonna

Processo cromatografico è sempre un processo batch, abbiamo alimentazione alla colonna e poi il recupero sequenziale delle diverse sostanze.

Possiamo operare non solo con un'unica fase mobile ma anche con più fasi mobili avendo quindi gradienti di concentrazione diversi perché la velocità di trasporto dipende sostanzialmente dall'affinità che il soluto ha con l'eluente e con la fase fissa. Quindi, se noi abbiamo un eluente che ha poca affinità con il soluto questo soluto tenderà ad interagire con il letto fisso e a rimanere nella colonna e quindi si riesce a separare i minori componenti che hanno meno interazione con la colonna, a questo punto passiamo ad un secondo eluente che ha una interazione maggiore con il materiale che è rimasto adsorbito sul letto fisso e riusciamo a questo punto ad eluire anche lui.

Miglioriamo così la selettività e accorciamo i tempi di cromatografia. Utilizziamo solventi di polarità diverse che hanno interazioni diverse con il soluto per ottimizzare la separazione e il tempo di operazione.

Cromatografia sullo stato sottile: abbiamo un piatto/carta ricoperto/a di gel cromatografico e abbiamo la soluzione che contiene specie con affinità diverse per i siti attivi del gel cromatografico e quindi questi sono trattenuti in maniera diversa sul sistema.

I sistemi industriali possono avere configurazioni diverse: possono essere sistemi a letto impaccato, possono essere degli impaccamenti di capillari o più semplicemente capillari vuoti.

Le unità possono essere molto diverse in funzione della portata da trattare.

Nella cromatografia in fase diretta la fase stazionaria è più polare della fase mobile es. fase stazionaria silice e fase mobile atil acetato o esano.

Nella cromatografia in fase inversa la fase stazionaria è meno polare della fase mobile per cui esempio: c18/ acqua, o ciano silice/acqua.

La fase stazionaria può essere naturale o sintetica.

I requisiti della fase stazionaria è che deve: essere selettiva, avere un'alta capacità e quindi una rapida cinetica di

interazione con il soluto, essere stabile nelle cond chimiche, resistere agli sforzi legati al passaggio di fluido, resistere allo sporco quindi deve essere facile da rigenerare e di basso costo.

La fase stazionaria è spesso un letto impacchettato di particelle solide supportate su materiale inerte.

Possono essere un supporto solido con un materiale attivo sulle particelle.

Vengono utilizzate anche lastre di vetro, carta plastica e fogli di metallo.

La fase mobile può essere un liquido o un vapore, in entrambi i casi è necessario che scorra sotto forma di strato sottile in maniera tale da garantire l'instaurazione quasi immediata dell'equilibrio con la fase solida. Nelle operazioni di cromatografia quindi si fa l'ipotesi di equilibrio istantaneo locale di adsorbimento e di interazione con la fase fissa.

Lo **scambio ionico**, tecnica più utilizzata per gli addolcitori dell'acqua, è utilizzata per rimuovere ioni dalla fase mobile rimpiazzandoli con ioni che sono meno legati alla fase stazionaria.

Tipicamente si ha una resina come argilla di sodio sulla quale si fa passare una corrente di acqua dura quindi con elevata concentrazione di calcio, sul materiale abbiamo scambio calcio-sodio per cui il calcio è trattenuto sull'argilla e la corrente di acqua viene addolcita in quanto la conc di calcio in soluzione risulta più bassa.

Esempio: serve anche per separare e purificare le proteine, una mix di proteine è alimentata ad una colonna che contiene una resina negativa neutralizzata con ioni sodio, le proteine neutre o cariche negativamente passano la colonna non disturbate mentre le proteine cariche positivamente vengono trattenute → prima separazione delle proteine cariche negativamente o neutre. Dopodiché facciamo passare sulla colonna una corrente concentrata in ioni sodio che spostano dai siti di adsorbimento le proteine cariche positivamente e quindi eluiamo anche queste e operiamo allora la separazione delle proteine.

La filtrazione con gel è un tipo di cromatografia nella quale la fase stazionaria è una resina con porosità fissata, le molecole più piccole entrano nella porosità e sono intrappolate nei pori mentre le molecole più grandi non entrano nella porosità e sono eluite più rapidamente.

A causa della maggiore interazione delle molecole più piccole con le porosità della fase stazionaria queste richiedono volumi di eluizione maggiori.

Se abbiamo tempo di ritenzione breve abbiamo eluizione di sostanze ad alto peso molecolare e a tempi di ritenzione più lunghi abbiamo eluizione di sostanze a basso peso molecolare.

Questo può essere accoppiato ad un'interazione chimica, quindi una size exclusion chromatography che sfrutta anche l'interazione con la chimica dei siti della fase solida del gel cromatografico.

Il cromatogramma mostra che le sostanze con più alto peso molecolare vengono eluite per primi seguiti dai soluti a peso intermedio e infine i soluti a peso più piccolo. Il V eluizione è il V totale - V porosità.

Infine nella cromatografia per affinità si sfrutta il fatto che il materiale cromatografico contiene dei leganti specifici per alcune molecole. Per esempio il materiale cromatografico ha in superficie gruppi glucosio che legano le proteine capaci di legare il glucosio quindi le tratteniamo, dopodiché facciamo passare una soluzione eluente ricca di glucosio liberando la proteina e quindi possiamo eluirla.

INOCULO Prof. Cristiani pt.2

Problema della curva di crescita: minimizzare la fase lag ossia la fase di acclimatazione.

Ogni volta che avvio un processo biologico devo mettere dentro i microrganismi in V e conc proporzionali al reattore che utilizzerò, se così non faccio mi creo dei problemi. Infatti una fase di acclimatazione troppo lunga potrebbe stressare la biomassa e portarla a morte oppure potrebbe portare cambiamenti nella produzione.

La fase di acclimatazione NON può essere eliminata.

In termini di tempo dipende dalla fisiologia del microrganismo, industrialmente parlando si lavora con la fisiologia in funzione del substrato su cui sto coltivando il microrganismo.

È una fase fondamentale che va in primis pensata ed analizzata; una volta ottimizzata questa fase va riprodotta ogni volta che si fa partire il reattore.

Tanto più è lunga la fase lag (che è una fase completamente improduttiva) tanto più il processo sarà costoso.

Lo shock che l'organismo subisce nel passare a V e a conc diverse o a composizioni diverse deve essere il minimo.

Sviluppo l'inoculo in modo tale che vada ad acclimatarsi e possa adattarsi gradualmente → minimizzo gli shock legati alle variazioni di V (man mano che aumento il V devo agitare di più, quindi aumenta il punto di stress dell'organismo).

Regola del pollice: ordine di grandezza per volta. Il n° di step dipende dal V del fermentatore finale.

SVILUPPO DELL'INOCULO

L'**inoculo** è quella quantità di microrganismo che ci serve per far partire la fermentazione, ci si riferisce proprio allo starter del processo. L'inoculo è quindi il materiale biologico di partenza.

La **semina** invece è sempre materiale biologico ma di partenza della fermentazione finale, è quello che ho ottenuto nel pre-fermentatore (nell'ultimo fermentatore appena prima di quello di produzione).

Lo sviluppo dell'inoculo è arrivare alla semina, sto operando per aumentare la biomassa e so già cosa fare grazie allo studio fatto in precedenza sull'inoculo stesso.

Se sto sviluppando per la prima volta il microrganismo devo capire la sua fisiologia e se può essere sviluppato sano e vitale sul mezzo che poi vorrò sviluppare. Dopodiché devo fare delle verifiche di controllo di qualità sull'organismo, le sue proprietà devono essere costanti e il microrganismo deve essere stabile.

Selezionato il microrganismo e selezionato il substrato, vado a studiare come si comporta il microrganismo durante la fase di sviluppo dell'inoculo.

L'instabilità nella fase dello sviluppo dell'inoculo è uno dei parametri che va a scartare molti microrganismi.

Gli organismi mutati tendono a retro mutare, sono molto instabili quindi hanno la tendenza di perdere le abilità per produrre determinati prodotti → motivo per il quale ogni volta è meglio partire da organismi "freschi".

Nel caso in cui abbiamo culture con più di un organismo la complessità aumenta.

Preparazione dell'inoculo: partiamo dalla fonte primaria, facciamo crescere il microrganismo su un mezzo solido, le colonie generate le mettiamo in un recipiente di dimensioni più grandi nel mezzo liquido uguale a quello della fermentazione finale.

Partiamo dalla fiala, inoculiamo il microrganismo su una piastra di petri, generiamo una prima semina con un mezzo minimale dopodiché le colonie sviluppate verranno inoculate nel mezzo che poi verrà utilizzato per la produzione (solitamente mezzo liquido).

Analisi in doppio e triplo significa fare la stessa analisi su due/tre beute diverse cioè su due/tre campioni diversi.

Le fiale dopodiché le conserverò per un certo tempo.

Attenzione: nel momento in cui stiamo generando delle fiale in n° consistente avremo bisogno di tempo, dobbiamo stare attenti che il tempo non sia troppo lungo, non dobbiamo cadere in tempi che potrebbero causare modificazioni nell'organismo. Vogliamo applicare un approccio statistico per cui vogliamo un grande numero di materiale da studiare. Ho bisogno di un numero adeguato di fiale di coltura, un protocollo di fermentazione della coltura dei semi e della fase finale, saggi validati per determinare quantitativamente i livelli delle variabili di risposta e una documentazione completa di supporto a tutti gli elementi citati.

L'obiettivo è andare a fare delle analisi per capire quanto l'organismo è sensibile ai tempi di sviluppo proprio.

Ho bisogno di materiale biologico sufficiente per poter fare le analisi statistiche, per studiare ad esempio la stabilità si fa analisi a breve e a lungo termine. Parametri di interesse sono i prodotti finali e la quantità di prodotto generato.

Dall'inoculo alla semina mi genero poi altro materiale biologico per controllare, controllo ad ogni step per cui ogni volta conservo qualche fiala e studio il parametro di interesse.

I parametri che si vanno ad analizzare possono essere l'ATP (se siamo in versione aerobica, se c'è ATP vuol dire che la fermentazione aerobia avviene), CO₂ emessa (ci dice quanto sta respirando l'organismo), DNA, RNA, se hanno flocculato (alcuni funghi stanno bene quando flocculano).

Considerazioni di sicurezza che riguardano i dispositivi e su dove lavorare, bisogna lavorare sotto le cappe e le protezioni dipendono dalla pericolosità dell'organismo con cui si sta operando. In generale si cerca di non utilizzare organismi pericolosi. La conservazione è fatta grazie al freddo oppure si possono porre in forme liofilizzati.

Bisogna partire sempre dall'inoculo puro, ci metto più tempo e magari costa di più ma rischio di meno. Bisogna essere certi delle condizioni di sterilità (l'asepsi deve essere mantenuta) e che gli apparecchi siano effettivamente puliti.

La fase lag può essere dovuta a: cambiamento dei nutrienti durante il trasferimento; cambiamento nell'ambiente fisico, ad es. pH, O₂; presenza di inibitore; germinazione delle spore; Vitalità della coltura al trasferimento; dimensione dell'inoculo. Tramite un prelievo si va ad analizzare il patrimonio genetico; è utile quando magari c'è un discostamento dai dati, in questo caso per esempio si fanno i confronti tra le fiale conservate e le fiale che invece hanno continuato ad operare. Si va ad analizzare anche per capire se il problema è endogeno quindi legato a mutazione degli organismi o esogeno quindi magari il flusso di O₂ o l'agitazione non è abbastanza.

Endogeno → il sistema tende a mutare ed è instabile, Esogeni → cose che vengono dall'esterno come tipologia del substrato o se c'è stata contaminazione/infezione.

Se non si può rimediare al problema si scarta l'organismo e si butta tutto.

ANTIBIOTICI

Un antibiotico è "...qualsiasi piccola molecola, prodotta da un microbo, con proprietà antagoniste sulla crescita di altri microbi...". A concentrazioni terapeutiche, è sufficientemente potente per essere attivo contro l'infezione con tossicità minima. Il fatto di poter produrre antibiotici diversi ha portato ad un alto sviluppo, passando per esempio dalla puntura ad essere un farmaco da ingerire ha fatto in modo che il prodotto potesse essere più diffuso.

Nel caso di produzione di antibiotici o pensiamo già ad una molecola oppure possiamo andare a vedere gli effetti di uccisione dei microrganismi provando.

Gli antibiotici β -lattamici sono stati la prima categoria di molecole scoperta con effetto terapeutico, contengono un anello β -lattame che è un anello a 4 atomi che forma un'ammide ciclica. All'inizio gli antibiotici erano costituiti praticamente solo da loro mentre ora ci sono antibiotici non β -lattamici che hanno attività biologica.

Problema: inseguire i microrganismi, questi mutano e sono in grado di sviluppare resistenza agli antibiotici quindi questi non hanno più effetto terapeutico e la malattia non è più combattuta.

I microrganismi sono molto più veloci a mutare di quanto noi siamo in grado di sviluppare gli antibiotici.

La resistenza agli antibiotici è stata sviluppata a seguito di un uso esagerato.

L'antibiotico è una molecola che ha effetto su qualcosa che è vivo cioè sui batteri, non ha effetto sui virus perché questo non è vivo. Il virus per riprodursi ha bisogno di un ospite, il substrato del virus è la cellula che il virus infetta, inietta il suo filamento di RNA e stampa se stesso lì sopra.

Tanto più uso l'antibiotico e tanto più si sviluppa la resistenza.

L'altro grosso problema è stato legato al mercato, siccome c'erano tanti antibiotici si ha pensato che non c'era più bisogno di svilupparne di nuovi in quanto le principali malattie avevano trovato una cura e quando alcune di queste malattie si sono risviluppate si è presentato un problema.

Gli antibiotici si suddividono in generazioni in base al periodo in cui sono stati sviluppati.

Gli antibiotici nel mangime degli animali da svezzamento servono a prevenire che insorgano malattie batteriche che potrebbero causare danni economici negli allevamenti intensivi, si vuole minimizzare la quantità di antibiotico nel mangime se non addirittura toglierlo per mettere altri sostituti (es. zinco/rame che distruggono i batteri ma che sono tossici quindi non si può esagerare).

Gli antibiotici agiscono ovunque, dipende dalla molecola ma a seconda di questa gli impatti sono su punti diversi cellulari; sono ad esempio inibizione della sintesi della parete della cellula, inibizione della sintesi degli acidi nucleici, inibizione della sintesi della membrana citoplasmatica, inibizione della biosintesi delle proteine e la modificazione del metabolismo energetico.

Nel caso della penicillina essa si spaccia per una sequenza di amminoacidi in quanto assomiglia molto a un anello β -lattame, siccome la parete è messa assieme da un'enzima e questo non è in grado di distinguere tra la penicillina e la sequenza di amminoacidi, le fa reagire esattamente come se fossero uguali.

Quindi prende l'antibiotico e lo ingloba nella costruzione della parete e alla fine la parete della proteina presenterà dei buchi (perché la catena primaria è costituita proprio dalla sequenza di amminoacidi), dato che non ho la ripetizione corretta genereremo dei buchi per cui l'interno non è più protetto da ciò che arriva all'esterno e viceversa e così l'organismo muore. Si sono così sviluppati degli organismi i cui enzimi poi sono stati in grado di distinguere la penicillina e la sequenza di amminoacidi giusta.

Quando la penicillina è stata introdotta per la prima volta, la maggior parte dei batteri Gram-positivi era sensibile a questo antibiotico. Ora molti sono resistenti a questo antibiotico. La resistenza deriva da un enzima che idrolizza l'anello β -lattamico (β -lattamasi). I geni che codificano per il fattore di resistenza sono codificati in plasmidi e sono, quindi, facilmente trasmessi da un organismo all'altro. Molti ceppi di batteri ora portano più resistenze agli antibiotici.

Screening antibiotico

Si generano delle pastigliette impregnate di antibiotico e vi è una pastiglietta che fa da controllo, queste pastigliette vengono poste su una piastra di petri riempita di agar nutriente su cui abbiamo inoculato l'organismo e andiamo a vedere dove si genera l'alone, andando a verificare così l'efficacia dell'antibiotico.

L'attività antimicrobica viene rilevata dall'inibizione della crescita intorno al disco impregnato.

Un'alternativa è fare dei cilindretti porosi: la sostanza in esame è posta al centro di un cilindro poroso.

Le sostanze antimicrobiche diffondono dal cilindro e inibiscono la crescita intorno al cilindro stesso.

Possiamo usare per esempio antibiotici diversi sulla stessa piastra, inoculata dell'organismo, cambiano le cinetiche perché le resistenze sono diverse rispetto alle pastigliette.

La cinetica dell'effetto è fondamentale e si basa sulla fisiologia della riproduzione dell'organismo, ci dicono di prendere un antibiotico ogni tot ore perché quello è il tempo in cui la quantità di patogeni è ancora bassa e dunque l'infezione riesce a non ripartire. Uno dei principali problemi è che non si possono somministrare quantità di antibiotico in modo elevato perché il farmaco è citotossico.

Vi è anche la possibilità di fare screening tramite diffusione con agar, in questo caso l'antibiotico affronta qualche batterio diverso, se l'antibiotico ha effetto per un po' l'organismo non si sviluppa, man mano l'effetto dell'antibiotico viene a mancare e quindi le colonie iniziano a svilupparsi.

Gli antibiotici sono metaboliti secondari quindi sono prodotti non legati strettamente alla crescita (stanno nella parte finale della curva). Noi dobbiamo fare produzione ma il problema è che devo farlo nella curva in fase di pre-morte ossia nella parte in cui vi è il gomito che inizia a scendere.

Devo produrre tanto e sono in fase di pre morte. Il problema è il tempo di vita dell'organismo.

Sono metaboliti che vengono sviluppati in condizione di stress, servono ad uccidere altri organismi.

Nell'ambiente naturale si sviluppano quando vi è scarsità di substrato, i sistemi metabolici riconoscono che c'è poco substrato quindi fanno prendere vie metaboliche diverse che portano alla formazione di una molecola che la natura ha voluto fosse un killer per gli altri organismi. :)

Bisogna lavorare a due stadi, abbiamo una prima parte in cui dobbiamo far avvenire la fermentazione con la crescita dell'organismo dove limiteremo i costi di produzione del microorganismo ed una seconda fase in cui do uno zucchero che si degrada più lentamente come un dimero o uno zucchero come il glucosio che, una volta degradato, possa essere una parte glucosio e un'altra parte no, il glucosio è metabolizzato in fretta mentre l'altro no e così la fase di pre morte è mantenuta più a lungo → modo di mantenere in vita il microorganismo.

Il microorganismo riconosce in questa difficoltà di degradare lo zucchero una condizione di starving e quindi sopravvive e al tempo stesso produce l'antibiotico.

I due stadi vengono fatti o in 2 reattori diversi, uno di crescita e l'altro di produzione, entrambi batch e quindi produco e trasferisco nell'altro reattore o in alternativa uso un unico reattore in cui faccio comunque 2 batch, il primo lo riempio sempre di glucosio ecc mentre nel secondo progressivamente attraverso il sistema fed batch modulo il substrato.

Se devo operar e con due reattori avrò i costi di due reattori: uno più grande, uno più piccolo e magari di due tipologie diverse e avrò il costo di un sistema di trasferimento, in questa fase avrò anche il problema del pompaggio della biomassa, potrei avere dei fenomeni di stress ma questi sono fenomeni di secondo ordine perché le condizioni del 2 reattore in realtà sono molto più importanti perché il microorganismo si troverà in condizioni di substrato che renderanno il problema prioritario rispetto a qualsiasi cosa.

Abbiamo due condizioni operative molto diverse nelle due fasi.

Nella prima fase devo essere in presenza di un microorganismo in grado di sopportare per il tempo stabilito il processo.

La distribuzione dell'ossigeno deve essere sempre assicurata.

Reattore agitato nel secondo caso mentre nel primo anche un reattore a vassoio (in quanto ho una muffa quindi può crescere anche solo su una superficie) ma di solito si usa comunque un reattore agitato.

Se ho reazioni redox esotermiche è necessario agitare per smaltire il calore, soprattutto nella prima fase.

Devo trovare un substrato in grado di aumentare la quantità di antibiotico prodotta.

Considerazioni: 1) La resa di un metabolita secondario può essere fortemente influenzata dalla composizione del mezzo e dai parametri chimico-fisici 2) La crescita e l'accumulo di biomassa avviene in due fasi successive le cui condizioni operative ottimali possono essere molto diverse 3) La struttura molecolare del prodotto può essere fortemente influenzata dai componenti presenti nel brodo 4) L'alimentazione di un precursore può guidare la biosintesi di uno specifico prodotto finale.

Problemi:

- 1) aumentare la produzione degli antibiotici e avere delle rese ragionate dal punto di vista industriale
- 2) poter produrre antibiotici con strutture diverse perché stiamo cercando di inseguire sistemi evoluti dei microorganismi

La soluzione del primo problema è stato affrontato in modi diversi, è stato necessario andare a studiare il percorso metabolico che portava alla produzione e capire gli effetti dell'ambiente esterno.

Se andiamo a vedere la curva di produzione della penicillina (processo batch plottato su una curva tempo e prodotto) e l'analizziamo quando non abbiamo ancora fatto interventi notiamo che vi è la curva dello zucchero (fonte di C) che è

massima all'inizio perché è consumato da pochi organismi e progressivamente decresce, la biomassa cresce di conseguenza e l'aumento della produzione di penicillina è proprio quando lo zucchero va a bassa concentrazione e produzione di biomassa praticamente costante.

La penicillina infatti viene prodotta nella fase di pre morte degli organismi.

Il pH ha un andamento un po' strano, durante la fase di crescita il pH decresce perché deriva dal consumo di zucchero e dal consumo dei vari componenti di substrato, una volta raggiunto il minimo dello zucchero il pH cresce proprio perché le vie metaboliche messe in atto dal metabolismo portano ad un aumento del pH.

Il tempo di produzione di penicillina è molto piccolo, il massimo di produzione è quasi rappresentabile da una gaussiana piuttosto stretta. L'aumento di pH ci sta dicendo che la biomassa è in fase di premorte.

Per aumentare la resa dobbiamo non produrre di più nello stesso tempo ma prolungare i tempi di fermentazione.

Si vuole portare la biomassa in fase premorte per tanto tempo.

Bisogna cercare di mantenere il pH a quel valore (pH 6,5-7)

Si agisce su quello che è il margine di intervento ossia il substrato.

La condizione che comunica al microrganismo che ci sono dei problemi e che potrebbe teoricamente morire è la condizione di starving cioè si fa in modo che il microrganismo abbia fame.

Non voglio mettere poco zucchero in partenza perché non voglio cadere nel gomito.

Si fa effettuando due processi; nella prima parte faccio crescere il microrganismo e quando arrivo a concentrazione ottimale per avere una buona resa cambio le condizioni, quindi io all'inizio gli darò tutto ciò che ha bisogno affinché cresca in fretta. Nella seconda parte fornisco uno **zucchero** che si degrada meno facilmente come lattosio (glucosio + galattosio) e durante la fase di degradazione il glucosio è trattenuto dall'organismo in modo che possa sopravvivere mentre il galattosio fa più fatica ad essere degradato per cui il microrganismo va in condizioni di starving allungando il tempo della premorte.

Infatti il fungo idrolizza il lattosio lentamente, rilasciando così il glucosio e il galattosio più facilmente assimilabili a un ritmo lento. Il micelio si comporta come se fosse semi-affamato e la biomassa produce penicillina per un periodo di tempo molto più lungo.

Ho anche il problema del pH.

Dentro il substrato ho **azoto**, l'altra fonte strettamente necessaria per il microrganismo, che usiamo per mantenere il pH costante. Possiamo tamponare il nostro sistema e basificare affinché il pH venga mantenuto nel tempo di fermentazione costante. Quest'operazione deve essere fatta solo nella seconda fase poiché nella prima fase un pH basico è un problema.

Si può utilizzare acetato di ammonio o lattato di ammonio come fonte di azoto al posto del nitrato per ridurre l'aumento del pH osservato alla fine della fermentazione. La sostituzione di queste fonti di azoto con fonti di azoto complesse, come l'idrolizzato di caseina, ha migliorato la disponibilità a lungo termine di azoto e ha ulteriormente stabilizzato il pH con miglioramenti nelle rese.

Pertanto, modificando le fonti di energia, carbonio e azoto, sono stati ottenuti significativi progressi nella resa del prodotto come conseguenza della crescita più lenta e della stabilizzazione del pH.

Per aumentare la resa possiamo andare ad aggiungere degli **intermedi** nel ciclo metabolico portando ad una produzione di una forma di penicillina più stabile e più facile da isolare. In linea di principio, aggiungendo derivati dell'acido acetico ai terreni di coltura, potremmo essere in grado di produrre un'ampia gamma di penicilline tra cui la penicillina V che è stabile a pH basso. Con il corn steep liquor abbiamo produzione della penicillina G.

La T è uno dei problemi che non si può ridurre. Avere un fermentatore chiuso significa avere ottimi livelli di asepsi. Antibiotici anomali simili ma con piccole parti diverse.

Fermentazione sommersa evoluzione della fermentazione in superficie.

I principali vantaggi dell'utilizzo di colture superficiali sono che ci sono pochi problemi nell'assicurare che le colture rimangano aerate e, a causa dell'ampia area superficiale e del sottile strato di terreno, ci sono pochi problemi con il surriscaldamento localizzato. All'inizio le colture erano considerate la via più praticabile per soddisfare la domanda del mercato di penicillina. È stato però stimato che sarebbe necessaria una coltura superficiale equivalente a 2 ettari per produrre la stessa quantità di penicillina di una fermentazione sommersa equivalente a 50 L. Il passaggio alle fermentazioni sommerse è stato quindi guidato da considerazioni commerciali. Nelle fermentazioni sommerse il *Penicillium notatum* diede risultati insoddisfacenti, si provò allora con il *Penicillium chrysogenum* con cui si ebbero rese maggiori.

(Molti organismi tendono ad aggregarsi, alcuni più di altri, e il problema è che è molto difficile fare arrivare al nutrimento agli organismi che erano contenuti nella parte più interna dell'aggregato → cambiato Penicillium.)

Possiamo operare o con un unico reattore fed batch oppure con due reattori di cui in uno facciamo operare la crescita mentre nel secondo facciamo la produzione.

In modalità fed-batch gli zuccheri vengono immessi nel recipiente, prima lentamente perché c'è poca biomassa da supportare, ma quando questa aumenta, aumenta anche la richiesta di zucchero.

Una volta completata la crescita, la velocità di alimentazione dello zucchero viene nuovamente ridotta ad un livello che mantiene la coltura e consente la produzione di penicillina.

Bisogna assicurare l'ossigeno necessario senza eccessiva formazione di schiuma e rimuovere il calore.

Operazioni in cascata di separazione, non si può andare direttamente a fare operazioni di purificazione.

Il downstream implica una serie di azioni unitarie via via sempre più raffinate e costose che sono sequenziali una dietro l'altra. Prendiamo, rompiamo e iniziamo a separare partendo dalle cose più grandi.

Il filtro che solitamente si usa è il filtro a tamburo rotante, dobbiamo iniziare a separare le cose più grossolane e poi successivamente fare le operazioni sulle cose più piccole. Perderemo delle cose in questo passaggio.

Lavoriamo con una molecola biologica quindi T non troppe elevate, essendo poi un farmaco non è consentito nessun residuo di nulla e quindi va purificato.

La penicillina ha la caratteristica di essere solubile in acqua se ha pH basico ed essere solubile in un ambiente organico se ha pH acido quindi cambiamo pH, trattiamo con butile acetato, estraiamo, ribasifichiamo e utilizziamo di nuovo acqua come estraente. Facendo questa operazione progressiva riusciamo a concentrare il prodotto.

Nel momento in cui andremo a fare la purificazione spinta la facciamo su un prodotto estremamente concentrato → V più piccoli da trattare e più comodità.

Si può operare anche semi sintetico, operare solo sintetico non si può perché le molecole sono molto complesse e i passaggi troppo grandi, problema: quando facciamo operazione chimica su queste molecole di questo genere non otteniamo mai l'enantiomero, otteniamo sempre il prodotto racemo (50% buono, 50% no).

Non c'è farmaco che consentano di vendere che contenga i due enantiomeri a meno che non si abbia dimostrato che l'altro non faccia male. Si può fare fermentazione via biochimica e le ultime trasformazioni si fanno utilizzando un enzima che è stereospecifico e stereo selettivo quindi prende il sintone finito e lo si trasforma mantenendo l'eccesso enantiomerico. Il microorganismo non è in grado di fare questo.

L'uso di enzima è ovviamente più costoso non conviene lavorare solo con enzimi perché il n° di passaggi è così grande perché dovremmo fare una batteria di reattori (per ogni enzima un reattore).

Facciamo produrre la penicillina, la prendiamo e la facciamo passare sul reattore che contiene l'enzima e la scomponiamo.

Altro modo di ottenere delle molecole ad attività biologica che siano diverse (quindi gli analoghi) è quello di usare gli inibitori metabolici, per usarli bisogna conoscere bene il metabolismo; una volta fatto ciò si può cercare di capire se mettendo determinate molecole si può andare a modulare l'attività enzimatica e quindi in qualche modo portare la reazione nella direzione desiderata.

Es. tetracicline, un microorganismo è in grado di secernere naturalmente il clorotetraciclina, se conosciamo bene il microorganismo e il suo metabolismo riusciamo a mettere nel substrato una molecola che va a inibire l'enzima che va a clorinare la posizione 5, succede che se l'enzima è inibito il microorganismo non farà la clorotetraciclina ma farà una molecola uguale in cui al posto del Cl c'è l'H, la tetraciclina.

Le tetracicline sono antibiotici potentissimi (di 2/3 generazione) che sono state prodotte a partire dall'analisi di questa molecola.

Un altro metodo è tramite l'uso di mutanti, es. molecola complessa che può avere in posizione 14 un gruppo R che può essere o un R (una catena) o un H o un OH. Che ci sia l'H o l'OH dipende da una cascata di reazioni enzimatiche. Ciò che veniva prodotto originariamente dal microorganismo era l'H.

La natura elimina completamente la via che non pratica, in realtà l'informazione genetica rimane ma quella non è più praticata e diventa silente allora ciò che si fa è generare un mutante in cui quella via viene riattivata.

Si va a riattivare una via che era stata eliminata in modo tale che invece di produrre una daunomicina sia possibile produrre un adnamicina che è la molecola ossidata grazie alla specificità di un'enzima.

ENZIMI: CATALIZZATORI BIOLOGICI

Catalizzatore molto attivo, stereospecifico e stereoselettivo, funziona a P e T ambiente.

Non c'è reazione biologica all'interno della cellula che non sia catalizzata da un'enzima.

Gli enzimi sono proteine che aumentano la velocità di reazione abbassando l'energia di attivazione, non viene alterato o consumato durante la reazione ed è riutilizzabile.

Gli enzimi che sono a disposizione di una cellula dipendono dal patrimonio genetico.

L'enzima opera attraverso un sito attivo. Ci sono catalizzatori non biologici ma omogenei che riescono ad avere stereospecificità e stereoselettività simili agli enzimi ma cambiano le cond operative.

L'enzima è una grossa proteina in cui tutta la parte proteica serve a dare la geometria al sito attivo e serve a dare la geometria a qualche altro sito (presente negli enzimi allosterici detti enzimi regolatori)

Nei punti critici c'è sempre un'enzima allosterico che può essere regolato e la regolazione avviene tramite prodotti e reagenti presenti, allosterico significa da un'altra parte perché spesso sono presenti due siti: uno di reazione e l'altro di regolazione, quest'ultimo mediamente è dalla parte opposta di quello attivo.

Proteina complessa e rigida → piccoli cambiamenti sul sito generano una serie di tensioni, cambiamenti di angoli di legame. Non tutti gli enzimi sono allosterici regolatori ma questi sono quelli più importanti perché sono sempre presenti nei punti più critici.

Il sito attivo è l'area dell'enzima in cui il substrato si attacca.

Il substrato può essere il brodo di cultura che serve per fare un processo fermentativo ma può assumere anche il significato di molecola sulla quale l'enzima esercita la sua funzione da catalizzatore.

Gli enzimi sono in grado di riconoscere mediante il sito attivo cose diverse.

Ci sono enzimi assolutamente specifici che riconoscono solo una molecola/substrato, enzimi meno specifici perché sono in grado di riconoscere gruppi di molecole e infine ce ne sono altri che non sono per niente specifici, lavorano su una tipologia di legami indipendentemente dalla molecola.

L'attività del sito attivo è spesso rappresentata dal modello chiave serratura, il substrato deve essere reagito e il sito attivo ha la geometria complementare a quel tipo di substrato. Essendo questo un modello molto rigido è stato superato per poter spiegare gli enzimi che lavorano con substrati un po' diversi.

La geometria è sempre correlata a ciò che deve essere fatto reagire ma non è così stringente.

Il modello attuale è il modello ad adattamento indotto in cui il sito attivo non è rigido ma flessibile. Le forme del sito attivo dell'enzima e del substrato si adattano per massimizzare l'incastro migliorando così la catalisi.

È un problema di tipo geometrico che poi si ripercuote nel problema chimico.

L'enzima è costituito da una grandissima parte proteica, la parte un po' più lunga da fare perché bisogna mettere in atto il ribosoma che stampa le proteine. Nel caso degli enzimi questa parte è già pronta, viene mantenuta una parte proteica con la sua struttura ma non funzionante. Non ci sarebbe motivo di far funzionare l'enzima quando non c'è necessità. La cellula allora prepara pronto ciò che è lungo da fare e lo lascia lì dormiente, nel momento in cui è necessario che la proteina diventi enzima la attiva.

L'oloproteina è la parte proteica degli enzimi la quale, legata a molecole non proteiche (coenzimi o cofattori), forma l'enzima attivo.

Il sito attivo fa in modo di alloggiare sia il substrato che il coenzima, una parte non proteica che può essere una molecola organica. I coenzima si legano transitoriamente ad un'enzima, sono molecole portatrici: trasportano atomi o elettroni oppure prelevano atomi o elettroni dal substrato.

Molto spesso è presente anche un cofattore, una sostanza piccolina non proteica (es. ione) facile da attaccare/staccare e da muovere nel citoplasma. La molecola dunque diventa un'enzima nel momento in cui il cofattore si attacca dopodiché all'interno dell'alloggiamento ci sarà la parte per il substrato e per il coenzima.

Gli enzimi allosterici hanno poi altri siti quindi altri posti (due o più) che invece vanno a fare da regolatori.

Gli step della reazione enzimatica sono tre, lo step più interessante è il primo ossia quello tra il substrato e l'enzima.

In presenza del substrato questo si alloggia nel sito attivo dell'enzima, forma il complesso attivato enzima substrato.

Step interessante perché va a determinare la velocità di reazione del sistema poiché alla fine dipende da quanti siti e dalla conc di substrato che è presente. È ciò che ci dice se quella reazione andrà a saturazione oppure no.

Alla fine l'enzima coordinerà tanto substrato quanto sono i siti attivi disponibili e liberi.

Una volta formato il complesso attivato questo viene trasformato e poi avverrà la reazione di sintesi.

Lo step 2 infatti è la reazione per convertire il substrato in prodotto, gli enzimi abbassano l'energia dello stato di transizione e quindi accelerano la reazione. Lo step 3 invece è dato dal rilascio dei prodotti che consentono ad un'altra molecola di substrato di legare l'enzima.

L'attività enzimatica può essere influenzata dalle cond ambientali (T e pH) in cui si trova l'enzima, presenza o meno di cofattori e coenzimi, presenza o meno di inibitori. Nel caso dei sistemi allosterici la presenza di inibitore è benvenuta. L'inibitore molte volte è il prodotto perché è il modo in cui la cellula regola l'attività enzimatica.

Nel caso dell'inibitore generale si parla di qualcosa che modifica attività enzimatica, ogni tanto addirittura la ferma ma NON a scopo regolatorio. È una molecola che casualmente si trova nell'ambiente di reazione che è in grado di andare ad interagire con l'enzima modificandone l'attività enzimatica ma non a scopo regolatorio.

T e pH denaturano le proteine, per questo che sono così importanti.

La maggior parte degli enzimi ha pH neutro (7) ma alcuni preferiscono condizioni acide o basiche.

La velocità di reazione aumenta all'aumentare della concentrazione del substrato, l'attività massima si verifica quando l'enzima è saturo.

Due categorie: allosterici e non allosterici, entrambi hanno problemi di funzionamento alle loro cond operative (T e pH). Hanno T e P d'esercizio che sono caratteristiche.

Entrambe le categorie sono soggette ad avvelenamento, anche gli allosterici hanno degli inibitori che non sono i regolatori, quindi vi sono molecole che possono andare ad interagire in modo specifico sul sito attivo andandone a fermare l'attività catalitica.

L'enzima regolatore cioè quello allosterico ha degli inibitori e attivatori suoi che però non sono a detrimento dell'attività enzimatica ma sono a regolazione di questa e quindi sono positivi in termini di effetto.

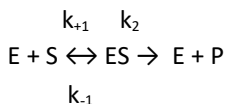
Il sistema degli enzimi allosterici è un sistema di autoregolazione cioè è la reazione che attiva o disattiva l'enzima per poter rispondere ai bisogni fisiologici cellulari.

Ci sono degli inibitori che equivalgono ai veleni es monossido di carbonio per l'emoglobina.

Ci sono poi gli enzimi delle cellule che per esempio vivono nelle condizioni marine che riescono ad operare a P elevate. Bisogna conoscere la T caratteristica dell'enzima.

Fondamentale la velocità di reazione, ricorda quella dei catalizzatori convenzionali, ha un andamento a massimo con asintoto. A seconda della concentrazione del substrato la velocità di reazione sarà diversa.

Giustificare perché il primo step ha un equilibrio e il secondo no. (domanda d'orale)



Il primo step è enzima + substrato che danno il complesso attivato e nel secondo step questo dà enzima ripristinato + prodotto. Non è detto che dal complesso attivato necessariamente si arrivi al prodotto, il complesso attivato a seguito di segnali cellulari può essere disfatto, l'equilibrio lì ha senso.

L'equilibrio dipende dal fatto che l'alloggiamento del substrato e l'alloggiamento del coenzima è quello che è quindi i reagenti entrano nel sito attivo, se tutto prosegue come deve proseguire c'è la trasformazione se no possono essere rilasciati perché non sono legami inscindibili, se lo fossero questi non si potrebbero più rompere e quindi avremmo degli inibitori non dei substrati.

Quindi in realtà la situazione originaria enzima + reagente può tornare esattamente così come era.

Nella seconda parte della reazione non c'è una doppia freccia perché il prodotto avrà una geometria molto diversa dal substrato che è stato fatto reagire. Questo è il motivo per cui il prodotto non torna nel sito attivo.

Equazione empirica (eq michaelis-menten) cioè equazione che cerca di descrivere il fenomeno (la velocità di reazione enzimatica), è stata derivata dalle osservazioni.

Nel caso di cose organiche è possibile misurare cose diverse, qui l'unica cosa misurabile è la conc di substrato (non è misurabile il complesso attivato, è misurabile l'enzima iniziale ma non durante la reazione).

È un eq in grado di esprimere la velocità in funzione della conc di substrato durante la reazione.

La costante Km rende conto della affinità che l'enzima ha per quel substrato cioè quanto l'enzima è in grado di interagire con quel substrato.

Curva descritta in modo banale: poco substrato, tanto enzima → velocità sarà grande, man mano che aumenta la conc

di substrato la velocità diminuisce, quando avremo raggiunto la massima conc di siti attivi avremo raggiunto l'asintoto. Curva descritta matematicamente invece tramite l'espressione di $v = V_{max} * C_s / (K_m + C_s)$. Ricorda l'eq di Monod. La velocità di crescita dell'organismo è legata alla velocità delle reazioni biochimiche che avvengono all'interno dell'organismo. Le relazioni da cui dipende la velocità di crescita dell'organismo sono tutte catalizzate per cui deve avere un andamento simile.

La regolazione è uno dei problemi principali del sito enzimatico. Sistemi di regolazione fanno sì che gli enzimi funzionino quando c'è bisogno e non funzionino quando non c'è bisogno.

Gli enzimi sono regolati attraverso delle cose particolari in più ci sono una serie di reazioni non desiderate (perché enzima può reagire con molecole con cui non dovrebbero reagire ma ogni tanto accade e quindi cambia la loro attività).

Enzima sistema cinetico → eq michaelis-menten, esprime la velocità in funzione della conc di substrato.

Importante capire la velocità enzimatica e se sto considerando un microrganismo capire come funzioneranno tutti gli enzimi all'interno della cellula. Gli enzimi possono essere attivati o disattivati.

Nel caso dei processi microbiologici la disattivazione o l'attivazione non richiesta sono entrambi un problema, nel caso dell'attivazione il problema è che dopo aver preparato un reattore, messo dentro un substrato e calcolato dei tempi (sto lavorando batch o al limite fed-batch) su cui ho tarato tutto il processo noto che dentro il substrato c'è una molecola che attiva gli enzimi di più e questo è un problema perché la quantità di substrato messa la dentro l'ho calcolata per avere una resa in un certo punto, se enzimi più attivi consumano substrato più rapidamente e quindi se il substrato viene a mancare si entra nella fase di morte dell'organismo o nelle condizioni di starving quindi vi sono delle molecole generate nella fase pre morte che sono molto dannose.

Non si arriva mai al gomito perché è pericolosissimo, piccole variazioni possono portare a catastrofi.

Se gli organismi iniziano a morire entrano in atto tutti quei meccanismi e quindi tutti quegli enzimi degradativi, le proteasi. Quel che succede è che un po' di microrganismi rimangono vivi e un po' muoiono, nel momento in cui muoiono entrano in gioco le proteasi che degraderanno tutte le proteine che trovano sul cammino → inizieranno a degradare anche i microrganismi vivi.

Siamo in una situazione auto catalitica e quindi biomassa va a morte → fermentazione da buttare.

La presenza di inibitori può portare alla disattivazione dell'enzima e quindi ad un abbattimento dell'attività e della velocità di reazione.

Ci sono 3 tipi di inibizione: competitiva, non competitiva e incompetitiva.

3 cose diverse, si parla sempre di disattivazione mentre nel caso non competitivo si parla anche di attivazione poiché usiamo gli allosterici. Può essere la stessa molecola ad attivare o disattivare.

Inibizione competitiva significa che una molecola compete con il substrato per il sito attivo dell'enzima, in questo caso particolare c'è competizione per il sito attivo e mentre il substrato viene trasformato la molecola che non centra nulla può interagire con il sito attivo ma non reagisce quindi ad un certo punto verrà rilasciato. Il problema è andare a calcolare il μ_{max} ossia quel valore di velocità che si ottiene quando gli enzimi sono tutti saturi.

All'inizio la velocità cresce molto perché ho poco substrato e tanti enzimi ma poi raggiunge l'asintoto quindi la saturazione. I calcoli si fanno con $\frac{1}{2}$ di μ_{max} ma se dentro ho un inibitore i calcoli non tornano.

Inibizione non competitiva legata alla presenza di un inibitore che non interagisce con il sito attivo ma interagisce con il sito allosterico cioè il sistema che l'enzima utilizza per regolare attività enzimatica; una parte dell'enzima non funziona perché siamo in presenza di qualcosa che va a modificare la geometria del sito attivo quindi tutte quelle molecole in cui sono presenti gli inibitori avranno il sito attivo modificato (se ho sito modificato reazione non avviene).

Le curve hanno un andamento simile ma in presenza di inibitore μ_{max} è più bassa.

Rendo quindi inattivo un certo numero di molecole di enzima. È quel che succede con i regolatori allosterici.

Utile per regolare le reazioni metaboliche perché è un metodo veloce, l'allosterico può essere o una molecola piccola o addirittura il prodotto che deriva dalla reazione dell'enzima stesso e quindi in qualche modo regolo la conc del prodotto oppure è un prodotto che proviene da un'altra via metabolica ma comunque concatenata alla reazione.

Reazione reversibile perché voglio poter regolare la velocità, è proprio un modo per regolare non per inibire.

Quindi non è detto che l'effetto di inibizione sia uguale sempre, l'effetto dipenderà dalle condizioni e in particolare dalla necessità del prodotto in quel momento.

Es. acido citrico, primo intermedio del ciclo di Krebs, è l'inibitore del primo enzima della catena glicolitica; è un

inibitore reversibile cioè posso modulare la catena glicolitica in modo tale da regolare il ciclo di Krebs e quindi la respirazione.

Inibizione incompetiva, viene messa in atto dopo che il substrato si è legato al sito attivo, l'inibizione si lega al complesso enzima-substrato e l'inibitore si lega lì.

L'enzima legge il substrato così come deve leggerlo, l'inibitore si lega lì e legandosi impedisce che il substrato venga trasformato e quindi la conc di substrato che viene trasformata è più piccola.

Nel caso degli allosterici l'inibitore è un regolatore. Enzimi regolatori sono quelli in punti strategici, sono in grado di essere attivati o disattivati da stimoli esterni o anche da stimoli interni cioè in funzione anche dei cicli metabolici. Sono in grado di gestire il funzionamento cellulare.

Sono quelli su cui noi puntiamo l'attenzione nel momento in cui vogliamo modulare un processo e a spingere su un prodotto piuttosto che su un altro.

In tutti e tre i casi di competizione il legame tra l'inibitore e l'enzima non necessariamente è irreversibile, se è irreversibile il danno è fatto e l'enzima non funziona mai più e l'organismo muore, se invece l'inibizione è reversibile allora si ragiona in termini di inibizione e basta e non in termini di distruzione.

Inibizioni irreversibili (in cat non biologica le chiameremmo avvelenamento) ce ne sono, per esempio il sarin è un gas nervino che interagisce con gli enzimi che hanno a che fare con interazione neurologica oppure il cianuro che è una molecola piccolina e fortemente inibitoria.

Gli enzimi sono in grado di fare regolazione da feedback, es. acido citrico sulla glicolisi.

Feedback negativo: il percorso è inibito dall'accumulo di prodotto finale.

Feedback positivo: una molecola regolatrice stimola l'attività dell'enzima, di solito tra 2 vie.

Regolare per rapporti e avere un intermedio comune significa avere un sistema di regolazione perfetto es. regolare rapporti aminoacidi, l'intermedio comune lo tengo in magazzino e lo faccio con tre vie di sintesi diverse e poi deciderò, dipenderà dai rapporti di conc di quegli amminoacidi. Nel momento in cui il rapporto è sbilanciato l'amminoacido va a fare da inibitore allosterico all'enzima e quindi blocca quella via verso quell'amminoacido.

Perché gli enzimi?

Mediano tutte le reazioni sintetiche e degradative negli organismi viventi e sono catalizzatori molto efficienti, stereospecifiche e regiospecifici. Lavoro in condizioni generalmente miti di T, P e pH.

Il loro utilizzo ha creato un'ampia varietà di processi industriali, prodotti di consumo e biosensori.

Rispetto all'uso delle cellule è tutto più semplice, sia per il reattore che per la produzione.

Il grossissimo vantaggio però è legato al downstream che solitamente rappresenta uno dei costi più importanti perché abbiamo molecole che hanno dimensioni diverse per cui non possiamo permetterci un sistema unico di purificazione.

Abbiamo concentrazioni piccolissime di un sacco di prodotti che sono molto simili.

Prima separazioni più grossolane poi quelle più raffinate e così via.

Alla fine quello che io ottengo è il substrato trasformato in prodotto grazie all'enzima, se c'è l'inibitore può coordinarlo sul sito attivo perché la molecola interagisca ma non lo trasformi.

Inoltre l'enzima il sottoprodotto non lo fa perché la reazione è substrato → prodotto.

La via chimica costa meno in termini di progettazione e reagenti, arrivo ad un certo punto e l'ultima trasformazione la faccio con l'attività enzimatica. Taglio così i costi del downstream.

Sul downstream non lo batte nessuno a T e P ambiente.

Svantaggi: devo cavarlo fuori da qualche parte.

Crearlo direttamente è complicato ma non impossibile ma dal punto di vista economico non conviene, quello che conviene farlo è cavarlo fuori da qualche parte: o da microrganismi o da funghi, piante o anche da animali.

L'enzima essendo una proteina è una molecola suscettibile a determinate modifiche di T, pH, agitazione ecc.

Se denaturiamo anche parzialmente la proteina poi questa perde la proprietà.

Non possiamo quindi permetterci delle estrazioni strong proprio perché altrimenti denaturiamo la proteina e disattiviamo l'enzima quindi, se si può, lo si purifica il meno possibile.

Però ovviamente più purifichiamo e migliore è l'attività dell'enzima.

Se è extracellulare è un più facile, la cellula lo butta fuori, lo ritroviamo nel liquido, separiamo solido-liquido, decidiamo cosa fare del solido (spremerlo, riutilizzarlo ecc) e dal liquido estraiamo l'enzima; abbiamo però il problema della conc di enzima prodotto e difficoltà nel processo di cristallizzazione.

Se l'enzima è intracellulare è un problema perché dobbiamo prima tirarlo fuori e poi rompere la cellula e abbiamo tutti i problemi di separazione e purificazione.

Ci sono alcuni enzimi così delicati e sensibili che si disattiva la cellula ma non si estrae l'enzima e si usa l'enzima all'interno della cellula mantenuta disattivata in maniera tale che l'enzima funzioni mentre il resto della cellula è praticamente morto (ma non degradato).

Si possono fare altrimenti un certo n° di step e poi accontentarci di un'enzima.

Altro grosso problema legato all'uso dell'enzima è che è molto uguale alle cose che noi vogliamo trasformare.

Il problema è che il substrato che vogliamo trasformare è molto simile all'enzima il quale farà poi il prodotto e alla fine ci troviamo un brodo che contiene il substrato, l'enzima e il prodotto per cui se vogliamo riutilizzare l'enzima dobbiamo separare il brodo per cui ho risolto in parte il problema e ne ho generato uno uguale.

La soluzione trovata a questo problema è utilizzare l'enzima NON libero e lo si immobilizza nel momento in cui viene immobilizzato abbiamo ottenuto il catalizzatore eterogeneo biologico e in questo modo l'enzima può essere usato più volte fino alla sua totale disattivazione. Siamo dunque in presenza di un processo continuo.

Pochi prodotti dovuti al fatto che la trasformazione è diretta. Stiamo andando verso l'industria di processo.

L'enzima, una volta estratto dalla cellula e immobilizzato, è in grado di operare anche in ambiente di solvente (anche non acquoso). Il tempo di vita di un'enzima usato in un ambiente non acquoso è però minore del tempo di vita dello stesso enzima in un ambiente acquoso.

La produzione industriale di enzimi comporta la coltura di microrganismi in fermentatori o bioreattori.

I microrganismi sono adatti per la produzione in larga scala di enzimi poiché: hanno tassi di crescita rapidi e sono in grado di produrre un numero maggiore di molecole di enzimi, possono essere geneticamente modificati per migliorare il ceppo e aumentare le rese, si trovano in un'ampia varietà di habitat diversi in modo tale che i loro enzimi siano in grado di funzionare in una gamma di T e pH, hanno requisiti di crescita semplici e questi possono essere controllati con precisione all'interno del fermentatore, possono utilizzare come substrato prodotti di scarto come scarti agricoli.

Delle centinaia di enzimi utilizzati industrialmente, più della metà derivano da funghi e lieviti e oltre un terzo da batteri. Il resto è suddiviso tra fonti animali (8%) e vegetali (4%). Bisogna verificare se l'enzima usato poi non abbia effetti indesiderati sul prodotto. Sono stati messi a punto dei protocolli di analisi ed una regolazione. L'enzima stesso può dare effetti collaterali come effetti di allergia e bisogna fare anche una serie di considerazioni su eventuali residui di molecole o di microrganismi che derivano dalla produzione di enzima, proprio legato agli aspetti di purificazione dell'enzima. Gli enzimi sono stati classificati in categorie A,B,C,D,E: enzimi che possono essere usati senza grossi problemi, enzimi che possono essere usati senza grossissimi problemi ma che possono dare effetti di allergia e così via. Se l'enzima è un'enzima che deriva da un microrganismo si va a verificare se c'è pericolosità.

Le caratteristiche organolettiche derivano dai sottoprodotti che derivano di nuovo dalla presenza o meno di enzimi.

La produzione dell'enzima parte da uno screening di ciò che serve, si sceglie quindi il microrganismo più adatto, si fa lo studio e poi si fa il pilota. È esattamente lo stesso metodo degli altri catalizzatori.

Possiamo brevettare l'uso di un'enzima per una speciale applicazione. Approccio industrialmente importante.

Il fatto di poterlo brevettare ci dà una copertura d'uso, soprattutto dopo aver speso tempo e soldi.

Per passare dal pristino (non purificato) e arrivare al n° 5 di step di purificazione si perde molto prodotto, la resa rispetto alla reazione diminuisce e l'attività specifica tanto più è purificato e tanto più aumenta (è come se andassimo verso un'enzima puro all'interno della cellula). I costi per peso aumentano tantissimo così come aumentano anche i costi di attività. Ciò che si fa è un bilancio, si gioca sui costi-benefici. Magari non mi fermerò allo stato pristino ma eviterò di arrivare all'ultimo passaggio di purificazione, a seconda ovviamente del microrganismo e dell'uso.

Screening enzima:

Step 1) determinare la potenziale necessità commerciale di un nuovo enzima e stimare le dimensioni del mercato.

Step 2) identificare una fonte microbica dell'enzima.

Step 3) identificare l'enzima: T per produttività ottimale, pH, stabilità, costanti cinetiche, presenza di substrato o inibizione del prodotto e la capacità di resistere a componenti della materia prima prevista diversi dal substrato.

Step 4) verificare: l'accettabilità dell'organismo alle autorità, produttività dell'organismo e modo in cui l'enzima deve essere isolato, utilizzato (libero o immobilizzato) e, se necessario, purificato. Se l'organismo è inaccettabile da un punto di vista normativo esistono due opzioni: eliminare l'organismo e continuare lo screening, oppure clonare l'enzima in un organismo accettabile.

I parametri che vanno ad influenzare la purificazione sono diversi: calore, tutti i metodi meccanici richiedono grande apporto di energia generando calore; effetti di shear, sul microrganismo da cui vogliamo prendere l'enzima il fatto che ci siano effetti di shear può risultare in diverse vie metaboliche che portano alla produzione di enzimi diversi; proteasi, possono causare una grave perdita di attività enzimatica; pH, chemical, alcuni enzimi possono subire alterazioni conformazionali in presenza di detersivi e/o solventi e tossicità dei materiali pesanti.

Produzione di bulk: uno dei problemi è produrre sufficiente enzima, come si fa?

Si convince il microrganismo a fare questo: si cresce il microrganismo e si fa fermentazione per esempio in eccesso di glucosio costringendo il microrganismo a produrre un'enzima che naturalmente non lo farebbe oppure per esempio si coltiva il microrganismo in presenza di pectina (si gioca con il substrato) quindi il microrganismo per poterlo usare ha bisogno di produrre un'enzima che possa degradare la pectina stessa spingendo così la produzione di enzima.

Una delle cose che si fa è quello di usare l'enzima immobilizzato, questo comporta dei costi e dei rischi ma poi posso utilizzarlo per lungo tempo → non c'è confronto con i tempi caratteristici di un processo biologico.

Vantaggi: enzima immobilizzato non devo separarlo.

Svantaggi: costi di immobilizzazione, eventuale disattivazione e minore attività.

I modi per immobilizzare gli enzimi sono molti, sia con metodi fisici che con metodi chimici.

L'utilizzo di metodi chimici presenta rischi di modificazioni del sito attivo perché i metodi chimici implicano la formazione di legami forti come legami sigma) e sono costosi mentre i metodi fisici come adsorbimento o intrappolamento (genera un network di fibre e intrappola l'enzima all'interno) sono meno costosi.

La forza di interazione vede che l'adsorbimento è il meno forte di tutti (perché abbiamo interazioni fra cariche), un po' più forti quelli dell'intrappolamento ma i più forti sono quelli chimici.

Il tempo di vita dell'enzima supportato dall'adsorbimento sarà più corto rispetto a quello in cui ho generato dei legami sigma. Farò anche qui un bilancio per capire quale metodo è il migliore.

Se abbiamo applicazioni molto fini e speciali si può anche scegliere un supporto più raffinato (e più costoso) ma più adatto al sistema. Anche l'adsorbimento può essere fatto in modi diversi: modi semplici come interazioni elettrostatiche o idrofobiche oppure generazione di legami (avere legami covalenti aiuta nella stabilità).

I sistemi di immobilizzazione possono essere usati anche agli organismi, per esempio nel trattamento delle acque di scarico; con gli organismi è più facile perché tendono naturalmente ad attaccarsi un po'.

Non è detto che l'immobilizzazione porti sempre ad una diminuzione dell'attività o alla disattivazione, il rischio c'è ma non accade sempre.

I reattori per i sistemi immobilizzati sono o reattori a membrana o sono i reattori tipici dell'attività catalitica.

ACIDO LATTICO

Si preferisce produrre l'acido lattico per via fermentativa.

Poco ATP vuol dire stesse possibilità di crescere ma più lentamente.

Intanto che sto crescendo l'organismo faccio produzione ma dato che è lento ne faccio poco.

Microrganismi estremamente vari nelle loro manifestazioni perché è vero che questa è una fermentazione anaerobia ma è anche vero che esistono fermentatori lattici che sono aerobio facoltativi (possono fermentare sia in modo anaerobio che aerobio → risultati diversi).

Si gioca su quello che si chiama il collo di bottiglia respiratorio cioè si alimenta più zucchero di quello che potrebbe essere respirato dal microrganismo, questo lo respira e trasforma l'eccesso di zucchero in qualcos'altro per via anaerobia. Non si lavora in condizioni di poco zucchero o di poco ossigeno ma si lavora in condizioni di eccesso di substrato. Il fatto di lasciar crescere l'organismo aerobio lo aiuta dal punto di vista energetico.

Si lavora a fed batch, lo si fa crescere in modo aerobio e poi lo si porta in condizioni anaerobiche oppure si può lavorare nello stesso reattore in queste condizioni.

Se i tempi non sono stringenti allora lasciamo che il microrganismo metabolizzi in modo naturale il substrato.

Se ho un problema legato alla produttività allora cercheremo di spingere la crescita del microrganismo per andare verso una produzione che possa sostenere il nostro processo.

Pasteur si rese conto che l'acido lattico non era un componente del latte ma un prodotto di fermentazione del latte, da qui inizia tutta la sua produzione industriale. Queste produzioni industriali fino a tempo fa erano state confinate solo all'industria alimentare (formaggio, yogurt oppure l'uso di acido lattico come preservante e conservante) ma negli ultimi tempi si sono poi specializzati nella produzione della molecola dell'acido lattico.

Nella sua forma libera l'acido lattico è tossico, lo si usa allora nella sua forma di lattato di calcio.

Applicazioni: 39% in acido polilattico che è sempre più richiesto, 13% additivi nel caso di formulati farmaceutici oppure cosmetici, 13% solvente o sostituto di altre molecole (come anticongelante) e 35% food and beverage.

L'acido lattico è un liquido da giallo a incolore ed è inodore. È l'acido idrossicarbossilico più semplice

Si può trovare in due forme otticamente attive, acido L(+)-lattico e acido D(-)-lattico. Gli isomeri puri hanno un valore maggiore rispetto alla miscela racemica perché sono utilizzati per specifiche applicazioni industriali.

Nella produzione di acido lattico per sintesi chimica si ottiene solo una miscela racemica, in cui le concentrazioni degli isomeri sono uguali, mentre la fermentazione consente di produrre un isomero in quantità maggiore.

La molecola di acido lattico si trova naturalmente nelle piante, nei microrganismi e negli animali e può anche essere prodotta dalla fermentazione dei carboidrati o dalla sintesi chimica di fonti fossili: C, prodotti petroliferi e gas naturale. Ci sono sintesi diverse oppure che implicano la degradazione degli zuccheri (fatto per via biochimica) per ottenere appunto la molecola; dal punto di vista economico però non sono sostenibili quindi non vengono praticate.

La produzione di acido lattico è fatta quindi sostanzialmente per via fermentativa (rispetto alla via convenzionale è più favorevole). La fermentazione microbica offre vantaggi, tra cui substrati rinnovabili economici, basse T di produzione e basso consumo energetico. La produzione mondiale di acido lattico da fermentazione microbica rappresenta circa il 90% della produzione totale di acido lattico.

Dobbiamo comunque abbassare i costi, possiamo intervenire sul substrato che rappresenta il margine d'intervento.

L'acido lattico può essere il sottoprodotto di un altro processo come bonifica delle acque o trattamento degli scarti → vantaggio economico perché comunque sia dovevamo trattare gli scarti.

Fermentazione associata alla crescita.

Con un processo continuo (ho un reattore, continuo ad alimentare e continuo ad estrarre) si può fare qualcosa legato al food o al settore farmaceutico solo se i microrganismi sono immobilizzati. Siccome i batteri lattici non sono particolarmente sensibili ci sono anche dei processi in grado di recuperarli e riutilizzarli.

Nel caso di un processo continuo il tempo di residenza è medio quindi non so mai cosa sto estraendo e a che punto sono sulla curva di crescita → non posso tracciare.

I microrganismi immobilizzati non crescono e se mutano lo fanno poco.

Le mutazioni sono tanto più importanti e tanto più rapide quanto maggiore è la crescita.

La progettazione del design è fatta in base a considerazioni biologiche ma anche economiche.

Ci sono substrati a basso costo come le biomasse lignocellulosiche (gli scarti dell'ikea) e c'è un grandissimo fermento scientifico per utilizzarle ma l'obiettivo è applicarle per le più svariate fermentazioni → il problema è che va pretrattato tantissimo, dobbiamo degradarlo affinché l'organismo sia in grado di fermentarlo e usarlo come substrato.

I costi di pretrattamento della biomassa fanno aumentare troppo la valutazione dei costi globali.

La biomassa lignocellulosica è la fonte globale di biomassa più abbondante. Per i materiali lignocellulosici bisogna rompere la cellulosa, separare la lignina perché se presente dà problemi durante la fermentazione, bisogna eliminare l'inibizione da feedback e eliminare tutti i problemi legati al metabolismo del microrganismo usato.

Un altro problema è dato dai sottoprodotti, questi sono molecole organiche, spesso simili al prodotto, e quindi rendono la separazione più difficile e più costosa.

È una *fermentazione inibita da substrato* cioè in presenza di elevate concentrazioni di zucchero i lattobacilli rallentano la loro fermentazione quindi la conc di zucchero disponibile deve essere dosata ad hoc.

I materiali amidacei come frumento, mais, manioca, patate, riso, segale, orzo sono potenziali materie prime per la produzione di acido lattico. I materiali amidacei possono evitare la repressione del glucosio, che si verifica quando un'elevata concentrazione di glucosio nel mezzo inibisce la crescita dei batteri lattici.

Circa il 90% dell'acido lattico disponibile in commercio è prodotto dalla fermentazione sommersa del mais.

Il substrato fa da inibitore agli enzimi che portano poi alle reazioni metaboliche.

Altro problema: *valori di pH* (naturalmente non abbiamo questo tipo di problema, sorgono solo durante la fase di produzione industriale). Il pH progressivamente decresce, arriviamo a valori di pH molto bassi e i microrganismi si fermano; dal punto di vista industriale questo è un problema perché stiamo accumulando all'interno del reattore acido lattico. Noi vorremo che il nostro microrganismo continuasse a produrre fino al livello di produzione da noi stabilito.

Allora si controlla il pH, si tende a tamponarlo per esempio con idrossido di calcio per formare lattato di calcio.

Se vogliamo vendere il lattato di calcio va bene ma se invece vogliamo vendere l'acido lattico in quanto tale quello che va fatto è poi una ritrasformazione in acido lattico.

Uno dei substrati che si utilizza nella fermentazione è il siero che deriva dalle produzioni casearie in cui viene prodotto l'acido lattico e si utilizzano batteri lattici. Il siero è quella parte acquosa proteica che si genera perché quando facciamo produzione di acido lattico cambia il pH, questo cambia la struttura delle proteine contenute nel latte restringendosi e quindi viene strizzato fuori il siero. Substrato buonissimo perché molto proteico, ricco di nutrienti essenziali per la crescita microbica e piuttosto puro quindi non ha bisogno di tanti processi di pretrattamento. Il siero di latte è comunque un prodotto da smaltire per cui in linea di principio si sta utilizzando uno scarto per produrre a sua volta acido lattico. Il siero viene utilizzato anche per produrre le proteine in polvere.

I microrganismi utilizzati nella fermentazione possono essere suddivisi in due gruppi: batteri e funghi.

La scelta del tipo di microrganismo da utilizzare dipende principalmente dal carboidrato che deve essere fermentato, poiché il metabolismo di un microrganismo differisce con le diverse fonti di carbonio.

I batteri lattici sono classificati in due grandi categorie: omofermentatori e eterofermentatori.

I primi danno luogo esclusivamente alla fermentazione lattica (glicolisi, acido piruvico che poi dà acido lattico) mentre i secondi danno acido lattico in quantità abbondante ma contemporaneamente danno una serie di altri prodotti come etanolo, acido acetico ecc...

I microrganismi che si usano per fare fermentazione lattica sono davvero tanti e sono in grado di fermentare substrati diversi. I batteri lattici non sono in grado di sintetizzare l'ATP tramite la respirazione e il loro principale prodotto finale della fermentazione degli zuccheri a risparmio energetico è l'acido lattico. La maggior parte dei batteri lattici è anaerobia facoltativa cioè tendenzialmente sono anaerobi ma possono anche fermentare in operazione aerobie.

La maggior parte sono termofili (soprattutto i batteri lattici) quindi la loro T di esercizio è intorno ai 40-50°C invece dei 30°C tipici di altri batteri. Normalmente hanno un'elevata tolleranza agli acidi e possono sopravvivere a pH 5 e inferiori, c'è il vantaggio di asepti perché buona parte di batteri a quei bassi pH muore.

Bisogna tenere conto delle conc di zucchero, dei valori di pH (misurato e controllato con sonde). Solitamente si lavora batch ma possono essere utilizzate anche modalità fed-batch o continuo, la scelta dipende dalle condizioni.

Una volta prodotto l'acido lattico il nostro obiettivo è separarlo e purificarlo.

Le operazioni dipendono se nel processo si ha usato omofermentatore o eterofermentatore, in quest'ultimo caso dovremo separare ciò che non è acido lattico quindi separazione solido-liquido e poi bisogna trattare il liquido.

In un processo batch non si va mai a consumo del substrato quindi abbiamo sempre un po' di substrato non reagito che a fine processo dovremo separare.

Anche in presenza di omofermentatore dovremo separare acido lattico quindi essendo questo un acido lo possiamo salificare facendolo reagire con una base (reazioni acido base facilmente applicabili e con rese anche abbastanza importanti). Nel momento in cui siamo in presenza di un sale però non è detto che il mercato richieda il sale prodotto perché ogni tanto richiede l'acido nella sua forma libera.

Se vogliamo ottenere direttamente l'acido lattico nella sua forma libera dobbiamo fare o *estrazione con solvente* quindi separazione usando un liquido estraente oppure una *separazione utilizzando membrana*.

La prima pone qualche problema in più perché spesso il solvente è organico e poi entriamo nei problemi degli equilibri (le estrazioni dei solventi giocano proprio su questi). Gli equilibri sono sempre un po' problematici, possiamo avere dei ritorni o ridissoluzioni del prodotto già separato quindi efficienza non sempre grandissima.

Meglio operare con piccole quantità per un n° di step maggiori.

Costi elevati a causa dei costi della necessità di area di scambio elevata e delle apparecchiature usate.

L'acido lattico è sicuramente un prodotto prezioso ma anche un prodotto che tendenzialmente non dovrebbe costare troppo perché ha molte applicazioni (conservante, monomero ecc...).

Con l'estrazione solvente otteniamo un prodotto puro.

I processi di separazione con membrana danno risultati ottimi, ottenuti non tanto con trattamento diretto con un'unica membrana ma operando in serie con membrane differenti perché i tagli che sono trattenuti dalle membrane dipendono dai pesi molecolari quindi si effettuano separazioni e purificazioni progressive.

Vantaggi sulla qualità del prodotto ma costi elevati perché si deve operare per step successivi (all'aumentare del n° delle operazioni unitarie aumenterà il costo finale e anche le membrane costano).

La separazione con membrana è piuttosto recente, separazione molto efficiente e ha il vantaggio di non produrre sottoprodotti. È un processo apparentemente molto semplice. Non è così comune che le cellule vengano riciclate al fermentatore, dipende dai microrganismi usati e dai lattobacilli (più robusti di altri microrganismi e quindi magari più

trattati oppure immobilizzandoli sulle palline possono essere riutilizzati).

Il riciclo dipenderà dal costo dei microrganismi e dal prodotto che vogliamo ottenere.

Anche senza riciclo cellulare la separazione a membrana consente di avere un prodotto puro e raffinato.

Il processo di separazione tramite membrane (che è sempre un processo successivo) dipende dalla dimensione e dalla forma delle molecole: man mano la dimensione di separazione di membrana diventa via via più piccola e mirata a ciò che deve essere separato. Effettuo ultrafiltrazione, nanofiltrazione e una filtrazione in grado di separare gli ioni e in questo modo riusciremo ad ottenere l'acido puro.

Le operazioni unitarie pur essendo tutte uguali vanno fatte in sequenza e progressivamente i costi di membrana e di separazione aumentano. Le membrane sono poi soggette a fouling.

Con il processo di *precipitazione* non abbiamo la possibilità di ottenere un acido direttamente.

Prima reazione salificazione con calce e formazione di lattato di calcio; se dobbiamo recuperare l'acido lattico nella sua forma libera facciamo un trattamento con un acido più forte (acido solforico) perché questo **sposta l'acido più debole dai suoi sali** → reazione di doppio scambio e quindi si ripristina l'acido lattico e si forma solfato di calcio.

Solfato di calcio (gesso) rappresenta un problema perché non sappiamo cosa fare, costa soldi perché dobbiamo smaltirlo in discarica ma diventa un rifiuto speciale perché proviene da fermentazione.

Il solfato di calcio è il sottoprodotto più comune che possiamo trovare nelle produzioni, c'è tanto gesso, ha valore 0 e quello che produciamo noi vale ancora meno in quanto è giallo e puzza (quindi non si può usare nemmeno nelle applicazioni building).

Gli svantaggi includono l'alto costo dei reagenti e la necessità di filtrazione e altri processi di separazione, otteniamo però un acido lattico abbastanza puro.

In questo caso si può usare una via alternativa ossia andare ad esterificare l'acido lattico facendone un estere metilico, idrolizzandolo si recupera l'etanolo e si ottiene l'acido lattico piuttosto puro → aggravio dei costi derivanti dall'uso del metanolo (molto tossico) e dalla purificazione.

Andando a fare due conti la precipitazione con calce è quella più usata industrialmente parlando.

Il processo di purificazione dipenderà però dalla purezza richiesta del mercato e dalle sue applicazioni.

L'acido lattico ha *applicazioni alimentari*, è uno dei conservanti più utilizzati.

L'acido lattico prodotto per via fermentativa veniva usato per fare l'acido polilattico (**PLA**) tramite polimerizzazione diretta dell'acido lattico stesso; era però difficile ottenere acido PLA ad alto peso molecolare, problema perché il PLA a basso peso molecolare ha poche applicazioni perché non ha le caratteristiche chimico fisiche giuste.

Ora si usa un processo catalitico in grado di fare un PLA ad alto peso molecolare a partire dalla depolimerizzazione del PLA a basso peso molecolare.

L'acido polilattico può essere prodotto per policondensazione diretta a T e P elevate, alla fine il materiale che si ottiene è costoso e nemmeno molto buono (anche se ad alto peso molecolare).

Si è pensato allora di produrre l'acido polilattico tramite intermedi con: produzione di questi intermedi, polimerizzazione e trasformazione in polilattico. Ho quindi produzione di oligomero e con trattamento catalitico si genera il lattide, questo viene aperto e polimerizzato per ottenere PLA ad alto peso molecolare con caratteristiche migliorate e connotati termoplastici e biodegradabili → processo green.

Acido lattico prodotto per via fermentativa (che può essere utilizzata per degradare scarti) e trasformato in un prodotto ad alto valore aggiunto che è un polimero biodegradabile da parte di microrganismi presenti in natura trasformandolo in CO₂, metano e acqua.

L'acido polilattico è in grado di comportarsi come un polimero termoplastico e ha caratteristiche meccaniche simile al polistirene, polietilene e polipropilene (quindi applicazioni simili ai polimeri derivanti da fonti fossili).

È utilizzato come packaging alimentare perché ha proprietà da barriera. Questa applicazione è importante perché un packaging biodegradabile va nella direzione green. La scarsa tenacità però ne limita l'uso in applicazioni che richiedono deformazione plastica a livelli di sollecitazione più elevati.

Il PLA ha *applicazioni mediche* perché viene utilizzato nell'ingegneria tissutale in particolare per le suture perché materiale riassorbibile e non tossico.

Viene usato nelle applicazioni ortopediche; uno degli obiettivi più importanti era evitare una seconda procedura chirurgica per rimuovere l'hardware non necessario. Tradizionalmente, in questa applicazione veniva utilizzato il titanio, ma, in questo caso, era necessaria una seconda procedura chirurgica per rimuovere il dispositivo in titanio.

Il polimero PLA è stato utilizzato per produrre viti biodegradabili e perni di fissaggio, placche e ancoraggi di sutura. Altra applicazione è quella del rilascio di farmaci, si sta andando verso la produzione di cronofarmaci ossia farmaci che possono essere rilasciati secondo una cinetica stabilita in funzione dell'effetto di medicamento che devono esercitare. La molecola che ha veramente attività biologica e con il principio curativo viene dispensata attraverso l'uso di sistemi biodegradabili nel tempo; abbiamo per esempio il principio attivo in strati diversi e quest'ultimi vengono degradati in tempi diversi controllando così la cinetica di consumazione. Si usano di solito dei carrier che sono polimeri, il PLA è tra questi.

Altra applicazione dell'acido polilattico è il *latte fermentato*.

I formaggi e i probiotici sono prodotti con obiettivo preservare le qualità nutritive del contenuto di latte.

Si può fermentare qualsiasi tipo di latte animale, il latte della renna ha un contenuto di grassi molto alto, sono tutti lattini trasformabili e fermentabili in formaggio.

Il formaggio è il prodotto fresco o stagionato ottenuto dal drenaggio di liquido dopo la coagulazione di latte.

Il latte è composto principalmente da proteine e grassi.

Le proteine, in particolare le caseine, costituiscono la principale "architettura" strutturale del formaggio.

Il grasso rimane intrappolato all'interno della matrice proteica del formaggio. I carboidrati, di cui il lattosio è il più importante, vengono per la maggior parte espulsi con il siero, mentre il resto viene fatto fermentare ad acido lattico.

I costituenti principali della frazione proteica sono le caseine e le proteine del siero di latte, queste ultime idrosolubili e quindi espulse con il siero.

Produzione formaggio: il latte del formaggio viene pretrattato e mescolato con il caglio. L'attività enzimatica del caglio provoca la coagulazione del latte in un gel solido noto come coagulo. Questo viene tagliato con appositi utensili in piccoli cubetti della dimensione desiderata per facilitare l'espulsione del siero.

Durante il resto del processo di produzione della cagliata, i batteri crescono e si moltiplicano, formano acido lattico dal lattosio. I chicchi di cagliata vengono sottoposti a trattamento meccanico con agitatori mentre contemporaneamente viene riscaldata la cagliata. L'effetto combinato di queste tre azioni – crescita batterica, trattamento termico e trattamento meccanico – si traduce in sineresi cioè espulsione del siero dai chicchi di cagliata.

La cagliata finita viene posta in stampi da formaggio e questo viene pressato. Il trattamento durante la cagliata, la pressatura, la salamoia e le condizioni di conservazione determinano le caratteristiche del formaggio.

Due problemi: instabilità del microrganismo e infezione da virus, se si sviluppa un virus in grado di attaccare i batteri che fanno fermentazione lattica è un grosso problema.

Un'altra cosa che sono in grado di produrre i batteri lattici sono le batteriocine o lantibiotici, molecole piccole che hanno in parte capacità antibiotica prodotte durante la fase di fermentazione lattica, sono in grado di essere attivi contro gli organismi Gram-positivi. Sono in grado di prevenire e rallentare il deterioramento da parte di una serie di batteri che portano alla degradazione di sostanze minerali.

Sono in grado di interagire con la parete dei microrganismi degradativi e patogeni che si sviluppano nei cibi conservati dando un effetto detergente quindi la presenza di batteriocina comporta una migliore conservazione dell'alimento.

Per prevenire muffe nei mais nei silos venivano inoculati dei batteri lattici al loro interno, i batteri fermentano abbassando progressivamente il pH andando a valori di acidità bassi, quindi le infezioni muffe non si verificavano e in parallelo si vide che la formazione delle batteriocine andava ad aumentare l'effetto di sterilizzazione messo in atto con l'abbassamento del pH e avevano l'effetto di asepsi e aiutavano a preservare la produzione alimentare.

Un altro metodo per conservare i vegetali è proprio dato dalla fermentazione lattica.

Operazione di *Pickling*, i crauti per esempio sono un prodotto fermentato dalla fermentazione lattica.

Questa fermentazione è anaerobia (quella lattica è per definizione anaerobia) ed è fatta in concentrazioni saline molto elevate. C'è una categoria di batteri in grado di dare fermentazione lattica e in grado di crescere in concentrazioni saline spinte. I vegetali vengono ammorlati in acqua e sale e automaticamente si auto sterilizzano (pH acido, 4.6).

A questo pH e in condizioni anaerobiche le verdure si conservano per lunghi periodi.

Il sapore sarà un po' salato e acido. È un modo per conservare la verdura per molto tempo, adesso è prodotto anche a scopo organolettico perché questo sapore è gradito ai consumatori.

Lo **yogurt** è il tipico probiotico, è un alimento che ha come obiettivo conservazione delle caratteristiche del latte e mantenere l'organismo vivo che rimane all'interno del prodotto caseario.

Ciò che è benefico sono i microrganismi lì presenti, i probiotici sono in grado di stimolare tutta una serie di molecole non solo a livello intestinale ma anche a livello cerebrale; sono aggiunti come integratori.

I probiotici più noti sono quelli contenuti nello yogurt: bifidobatteri, lattobacilli, streptococchi.

Fermentazione simbiotica cioè la produzione dello yogurt richiede almeno due microrganismi, normalmente il lattobacillo bulgaricus e lo streptococco termofilo, hanno condizioni operative diverse (soprattutto la T); vengono inoculati insieme in conc diverse. Viene prodotto soltanto acido lattico; ciò che rende buono lo yogurt è il coagulo e la cagliata generata in situ a seguito della fermentazione lattica. L'acido lattico fa cagliare il latte e fa espellere il siero. Ciò che produce un microrganismo è stimolante del metabolismo dell'altro e viceversa, la fermentazione lattica degrada il lattosio e si ottiene glucosio e galattosio. Gli organismi degradano rapidamente il glucosio fino a formare l'acido lattico mentre il galattosio rimane all'interno del prodotto.

I due batteri hanno T di esercizio diverse, il bulgaricus è presente all'inizio a T più basse mentre il thermophilus è presente a T più alte; il rapporto tra i due dipende dalla T. L'inoculo viene fatto più o meno a 42°C.

Il bulgaricus produce una serie di amminoacidi che stimolano il metabolismo dello streptococco, questo a sua volta produce acido lattico e CO₂ che stimolano invece il metabolismo del bulgaricus.

Il valore di pH che può essere raggiunto a fine fermentazione è diverso a seconda dei due microrganismi.

La fermentazione va avanti con copresenza dei due microrganismi con il bulgaricus che produce più acido lattico quindi è in grado di abbassare il pH della fermentazione mentre il thermophilus solo fino a 5. Con il tempo questi due microrganismi portano ad un abbassamento del pH che si setta intorno a poco più di 4.5, qui la fermentazione si ferma. Il latte di partenza come nel caso del formaggio deve essere standardizzato in termini di grassi, se troppo grasso non va bene per essere fermentato dai lattobacilli.

Quindi si fa operazione di affioramento e scrematura e il latte subisce anche il riscaldamento (per pastorizzarlo in modo tale che ci siano poche concentrazioni di altri fermentatori).

La fermentazione può essere fatta in due modi diversi: una in reattore dopodiché il prodotto viene separato per preservare la conc di microrganismi, l'altra fatta direttamente nel pacchetto.

La frutta dentro lo yogurt può essere messa o in pezzi o in forma di puree.

PRODUZIONE DI ACIDI ORGANICI

Ci interessano gli acidi organici prodotti per via fermentativa, lo stesso acido lattico è prodotto in questo modo ma lo differenziamo in quanto gli acidi organici che analizzeremo fanno parte di cicli metabolici aerobi.

Gli acidi organici di interesse industriale sono quelli che stanno dentro il ciclo di Krebs e quelli che vengono generati a opera di un'ossidazione successiva del glucosio; derivano dunque da processi metabolici.

Gli acidi organici che vedremo sono o acidi intermedi o acidi terminali di un ciclo metabolico.

Prodotti terminali come acido lattico, acido acetico o gluconico → le cond di accumulo e di sintesi vanno di pari passo.

Nel caso della fermentazione lattica il prodotto finale è l'acido lattico, questo è rigorosamente associato alla crescita e quindi quando facciamo fermentazione lattica cresciamo microrganismo e facciamo acido lattico.

Diverso è il caso di altri prodotti come acido citrico, acido itaconico, questi prodotti sono comunque associati alla crescita perché senza l'acido citrico non può crescere.

Sono intermedi e quindi le cond operative vanno gestite in modo da procedere all'accumulo.

L'acido organico per definizione è un composto a basso peso molecolare che contiene uno o più gruppi carbossilici.

Il capostipite e l'acido più prodotto è l'**acido citrico, questo è un acido tricarbossilico** quindi ha tre funzioni COOH e questo andrà ad influire sul processo. Sono bio-acidi perché sono prodotti da microrganismi e macroorganismi durante la respirazione, hanno applicazioni molto grandi (food, cosmetici, industria tessile, bioplastiche ecc).

Possono essere anche estratti ma non è conveniente, nel caso dell'acido citrico la fermentazione è quella preferita.

In tutti questi casi interviene anche il DNA technology perché i microrganismi una volta selezionati sono poi generalizzati per avere grande produttività.

L'acido citrico è uno dei prodotti più prodotti insieme all'acido acetico.

L'acido acetico può essere prodotto anche da fonti fossili attraverso un processo di catalisi omogenea ma non può essere usato per esempio nell'ambito della cosmesi (deve essere prodotto via fermentazione).

I protagonisti sono: acido citrico, fumarico, itaconico, gluconico, malico, lattico e acetico.

Possono essere di due categorie, una legata ai cicli di acidi tricarbossilici e l'altra derivanti dall'ossidazione del glucosio.

Essendo acidi che stanno all'interno dei cicli metabolici il problema è legato al fatto che se sono intermedi vengono consumati rapidamente e al tempo stesso le conc di questi prodotti sono molto bassi, nel caso del lattico problema

meno importante perché se l'organismo cresce produce acido lattico essendo il prodotto strettamente legato alla crescita (massima resa con massima crescita e acido lattico prodotto terminale della fermentazione). Dovremo pensare ad un ciclo produttivo che assicuri accumulo dell'intermedio. Abbiamo diversi produttori tra cui l'*Aspergillus niger*, riesce a produrre anche in grandi quantità l'acido citrico. Ogni microrganismo è associato a diversi substrati, produrranno quindi in quantità più elevate quando associati ai substrati giusti.

ACIDO CITRICO

L'acido citrico è un sale cristallino bianco inodore, è acido al gusto, fonde a 153°C e si decompone prima di fondere, è molto solubile in acqua e alcool e ha effetti corrosivi perché ha un pKa piuttosto basso. Si trova nelle cellule.

È il primo intermedio del ciclo di respirazione ed è anche presente nella frutta. Originariamente l'acido citrico veniva ottenuto attraverso un processo ad estrazione. Ha usi svariati, può essere utilizzato come conservante, cibo e bibite, detergenti, depurante di olio per friggere, pannolini come adsorbitore ecc.

È in grado di dare effervescenza e insieme ad altri aromatizzanti dà il sapore di arancia o limone.

La fermentazione può essere operata in due modi: come cultura in superficie sia su substrato solido che su substrato liquido oppure con culture sommerse (consentono in piccoli spazi di produrre tanto soprattutto al riparo da problemi climatici o stagionalità).

Esistono una serie di substrati per la produzione dell'acido citrico, dipendono anche dall'uso dei microrganismi, per esempio sono melassa di barbabietola, sciroppi, succo di canna da zucchero e frazioni di olio.

La reazione è la conversione del glucosio, questo viene fatto all'interno della cellula.

È un processo che ha bisogno di ottimizzazione dello zucchero, gli enzimi dei microrganismi produttori sono sensibili alle elevate conc di substrato e sono ancor di più sensibili alle elevate conc di prodotto.

Abbiamo quindi inibizione sia dal substrato che dal prodotto → problema perché non basta aumentare lo zucchero per avere massima produzione di acido citrico.

Per il substrato studiamo l'andamento dell'acido citrico in funzione della conc di zucchero e devo arrivare a conc di prodotto accettabili sia dal punto di vista industriale che dal punto di vista biologico.

Originariamente i produttori erano i funghi attualmente si usano anche lieviti o batteri.

Elevate conc di acido citrico possono essere ottenute in presenza di *Aspergillus niger*, produttore ottimale che è in grado di trasformare l'80-90% di zucchero in acido citrico.

È una fermentazione a microrganismo completo che implica l'uso della catena metabolica della respirazione.

Altra grande capacità produttiva dell'*Aspergillus* è per produrre gli enzimi.

La biosintesi è la classica via glicolitica più acidi carbossilici.

Problema: l'acido citrico è il primo intermedio del ciclo di Krebs e questo assieme alla glicolisi sono cicli fondamentali per la sopravvivenza del microrganismo e quindi le conc di queste molecole sono stabilite da enzimi regolatori.

L'acido citrico è un intermedio per produrre ATP per cui la cellula andrà a regolare l'acido per cercare di regolare i vettori energetici. Il problema è legato al fatto che, essendo l'acido citrico un inibitore dell'enzima, nel momento in cui si accumula l'attività dell'enzima viene terminata.

Dobbiamo interrompere la sua degradazione e interrompere l'effetto di inibizione sulla fosfofruttochinasi quando la conc di acido citrico aumenta al di là dei valori previsti dal metabolismo cellulare.

Bisogna rimuovere l'inibizione del citrato sulla fosfofruttochinasi, se non dovessimo rimuovere questa inibizione nel momento in cui stiamo accumulando l'acido citrico il processo si ferma per cui non avremmo più reagente da trasformare in acido citrico.

Un altro problema è dato dal fatto che l'acido citrico viene degradato all'interno della cellula perché il ciclo va chiuso, se il ciclo non viene chiuso il microrganismo muore; anche qui dovremo agire sugli enzimi degradativi.

Dobbiamo fare in modo che il microrganismo possa prendere una via alternativa degradativa e andare a chiudere il ciclo in modo tale che possa sopravvivere.

Interveniamo agendo sul substrato, siamo così in grado di effettuare questi interventi: un mezzo ricco di ammonio e deficiente di manganese è in grado di rimuovere l'inibizione sulla fosfofruttochinasi, un mezzo che venga depauperato degli ioni Fe e venga addizionato degli ioni Cu è in grado di sostenere la produzione di acido citrico evitando la trasformazione ad isocitrato con possibile scelta da parte del microrganismo di una via laterale.

Il citrato si accumula perché siamo stati in grado di bloccare l'inibizione e poi avendo fatto in modo di non bloccare complementare la trasformazione di isocitrato, lasciamo che un po' di questo prenda una via alternativa e vada verso glicolato e si trasformi in acido malico.

Quindi andando a modificare il substrato riesco a fare ciò:

- 1) Elevate conc di ammonio rimuovono inibizione sulla fosfofruttochinasi.
- 2) La presenza di ioni rame rallenta un po' tutti i processi e inibisce tutti i cofattori quindi consente l'accumulo di citrato.
- 3) La rimozione di ioni ferro porta alla trasformazione totale in isocitrato.
- 4) L'utilizzo di fonti di glucosio migliori in cui il glucosio è maggiormente disponibile (tipo il melasso) sono in grado di favorire la scelta di via alternativa e quindi di preservare il microorganismo vivo.
- 5) Rimozione degli ioni manganese magari non totale in modo tale da favorire la permeabilità della cellula, l'acido citrico è un acido che è intracellulare e quindi se noi siamo in grado di modificare tramite l'uso di Mn e ammonio siamo in grado di generare dei buchi nelle pareti in modo tale da far uscire acido citrico e far generare azione di massa → aumento acido citrico.

Il processo può essere fatto fed batch ma è preferibile fare un processo **batch a due stadi** perché le cond di crescita e le cond di produzione sono molto differenti. Il microorganismo viene cresciuto in cond sani e vitali e generalmente con fermentazione di superficie in modo tale che non ci sia neanche l'effetto di shear dopodiché viene trasferito nel reattore di produzione in cui le cond operative sono molto diverse.

La prima parte di produzione può essere fatta sia su superficie che sommersa, quel che si preferisce è far crescere il microorganismo superficialmente (quindi fermentazione di superficie) perché in questo modo gli effetti di shear (bisogna distribuire ossigeno in modo efficiente ed essendo un processo aerobio ossidativo aumenta la T e quindi dovremo smaltire il calore agitando) si evitano. La fase di produzione dura normalmente 5 giorni e si svolge in fermentatori aerati agitati a 30°C. La regolazione della concentrazione di ossigeno disciolto nel mezzo avviene tramite l'alimentazione d'aria, l'aria pressurizzata e la velocità della girante.

Al crescere del tempo cresce l'acido citrico e diminuisce lo zucchero.

Punti critici della fermentazione sommersa: la formazione delle ife deve essere inibita (aumentano viscosità), controllo pH, T e O_2 , i metalli devono essere rimossi, l'azoto viene aggiunto come nitrato o solfato.

La formazione delle ife e la distruzione delle ife a causa delle agitazioni è uno dei punti critici, se sono rotte il microorganismo non cresce più e non produce più acido citrico.

I microrganismi sono o l'*Aspergillus niger*, altri aspergilli, candide e lieviti.

Vogliamo aumentare le rese e possibilmente usando un substrato che costi meno per abbassare i costi → cambio microorganismo, sono state proposte le candide perché queste degradano substrati non ricchi come il melasso.

Il processo di separazione ha grosso modo lo stesso problema di separazione dell'acido lattico quindi viene effettuato ma dipende in base a cosa vogliamo ottenere.

La cosa migliore è trasformare l'acido in sale aggiungendo calcio e ottenendo citrato di calcio (molto richiesto) ma anche l'acido citrico nella sua forma libera ha richiesta di mercato.

Effettuo una *precipitazione* (come con l'acido lattico) quindi tratto l'acido citrico con idrossido di calcio, ottengo citrato di calcio, ripristino la funzione acida trattando con acido solforico e quindi ottengo acido citrico e solfato di calcio.

La produzione di solfato di calcio è un problema perché prodotto in grandi quantità.

Se considero poi il peso molecolare dell'acido citrico e quello del solfato di calcio in termini massivi noto che si produce più quest'ultimo che il primo. Problema che non ha ancora trovato soluzione.

In questo caso specifico stiamo salificando un acido tricarbossilico con uno ione bivalente → con i conti stechiometrici già in termini molari la quantità di solfato di calcio è molto grande.

Si applicano principalmente separazioni con *estrazioni di solvente* ma abbiamo nuovamente problemi legati agli equilibri e costi legati a come estraiamo.

L'acido citrico è un prodotto intracellulare quindi dobbiamo rompere il micelio, motivo per cui si cercano di allargare i pori della membrana del microorganismo in modo tale che l'acido citrico venga secreto.

Operazione di estrazione utile anche per portare l'acido citrico nel brodo di cultura.

Si può effettuare anche la cristallizzazione diretta con cui si ottiene un prodotto puro.

Visione globale del processo produttivo con *Aspergillus*: proposta a due step, crescita e accumulo, pH deve essere

intorno a 4 e scende durante la fermentazione (aspergillus cresce meglio in ambiente acido essendo anche un produttore di acido). Il processo produce le massime rese di acido citrico e viene completato entro 4 giorni. I nutrienti vengono sterilizzati prima dell'inoculazione. Il mezzo di fermentazione viene acidificato con acido fosforico a pH 6.0 ed è richiesto un raffreddamento durante l'accumulo di acido citrico.

Fermentazione a superficie a substrato liquido, i vassoi sono riempiti con il substrato liquido, o a substrato solido, usato di più nei paesi asiatici, è meno produttivo perché servono grandi spazi e superfici.

Per produzioni più piccole si può fare fermentazione a superficie, viene messa a punto una superficie/substrato su cui poi viene seminato il microrganismo che poi farà la fermentazione.

Il substrato è formulato in modo da poter effettuare la crescita e lo sviluppo e la produzione di acido citrico.

Se il substrato è solido si usano principalmente gli scarti dell'industria agricola come barbabietola o patate dolci. Gli scarti della produzione di barbabietola da zucchero sono preferiti perché sono meno costosi. Gli scarti vengono tagliati in pezzi, sterilizzati e immersi in melassa o sciroppo di saccarosio e quindi vengono inoculati.

La conversione dello zucchero è del 45% quando si utilizza la melassa e del 55% nel caso del saccarosio.

Scarti delle patate dolci usati come substrato solido in Giappone.

È utilizzata quando la produzione di acido citrico vuole essere effettuata come modo per trattare gli scarti.

Con il substrato liquido la fermentazione è un po' più efficiente: la melassa viene pretrattata in un reattore agitato e addizionata di acido solforico fino a raggiungere pH 5,5-6,5 e addizionata di nutrienti. La miscela viene sterilizzata con vapore e si aggiunge acqua sterile fino a raggiungere una percentuale di zucchero del 15-20%. Il substrato viene distribuito in vaschette di alluminio, la fermentazione viene condotta in 8-10 giorni con pH finale = 2.

Si ottengono acido ossalico e gluconico come sottoprodotti.

La fermentazione avviene in vassoi poco profondi; i requisiti per l'impianto sono: condizioni di asepsi all'inizio e assicurare passaggio di aria calda e umida sui vassoi.

Per soddisfare la richiesta mondiale si fa fermentazione sommersa.

ACIDO ACETICO

Mercato non piccolo perché ha applicazioni alimentari, farmaceutici e cosmetici.

Deve essere usato acido acetico prodotto tramite via biotecnologica. L'acido acetico utilizzato anche negli aceti da tavola può essere fermentato sia mediante processi aerobici che anaerobici.

Nel caso della produzione di aceto la base di fermentazione saranno gli scarti della produzione di vino, nel caso invece della produzione di acido acetico si parte da glucosio che poi viene a sua volta convertito in etanolo e poi successivamente portato fino alle condizioni di acido acetico.

Reazione di ossidazione successiva dell'etanolo con acido acetico come prodotto terminale.

Il Clostridium, microrganismo potenzialmente patogeno, usato perché trasforma glucosio in acido acetico con un singolo step anossico. Si usano invece i batteri acetici per produrre acido acetico a scopo alimentare.

Il metodo di fermentazione è o un metodo di superficie, in particolare si usa il trickle bed reactor o una fermentazione sommersa. Con la fermentazione di superficie il reattore viene riempito con materiali che presentano porosità o superfici tali per cui il microrganismo possa ancorarsi e possa essere alloggiato, sono supporti non fermentabili da parte del microrganismo. I supporti vengono seminati sulla sup del microrganismo.

La maggior parte del microrganismo esposto al substrato è fatto percolare e durante la fase finale il prodotto (etanolo) è fermentato fino ad acido acetico. È possibile ottenere conversioni molto alte di etanolo in acetico.

Uno dei punti critici è la conc di etanolo, tossico e può essere tollerato in conc diverse dai microrganismi, nel caso dei batteri acetici la conc ottimale va dallo 0.2 al 5%. Questa conc di etanolo porta a produttività più basse ma la conc di etanolo è legata alla sopravvivenza dell'organismo usato durante la fermentazione.

Si può operare con il riciclo del substrato oppure sviluppo organismi che siano in grado di tollerare valori di etanolo in partenza più elevati.

Esiste poi un processo di produzione di acido acetico fatta per fermentazione sommersa che è in grado di dare produzioni con produttività importanti.

Vengono utilizzati principalmente substrati a bassa concentrazione alcolica come frutta e vini.

Ad esempio l'aceto da tavola viene prodotto attraverso un processo semi continuo completamente automatico sotto continua agitazione e aerazione. Il processo di fermentazione viene condotto fino a 35 ore a una T di 40°C.

La resa dell'acido acetico è di circa il 98% in un processo completamente continuo.

ACIDO ITACONICO

L'acido itaconico è un intermedio del ciclo di Krebs e uno dei prodotti di degradazione successiva dell'acido citrico. Si sceglie l'*Aspergillus itaconicus* e l'*Aspergillus terreus* in grado di accumulare grandi quantità di acido itaconico. Può essere prodotto o con trasformazione dell'acido citrico seguendo la via di Krebs convenzionale oppure se messi nelle opportune condizioni di formulazione di substrato i microrganismi sono in grado di prendere una via parallela e diversa che è in grado di arrivare direttamente all'acido itaconico.

Si parte dagli scarti, è una fermentazione aerobia con aerazione continua per 18 h e T di esercizio tra i 33-37°C, la fermentazione prosegue per circa 2 giorni e l'accumulo dell'acido è massimo se il pH è mantenuto costante fino a 3.8. Una volta arrivati al prodotto di fermentazione la biomassa è macinata, viene estratto l'acido itaconico rimasto all'interno della biomassa e viene separato e purificato.

La separazione dell'acido itaconico è fatta esattamente nello stesso modo della separazione dell'acido citrico, si fa interagire il brodo con una base, si separa l'itaconato che così si forma e poi quando necessario si ripristina l'acido itaconico liberandolo dai sali.

Come base non si usa molto l'idrossido di calcio perché l'itaconato di calcio è molto appiccicoso ed è difficile da recuperare, meglio usare idrossido di ammonio formando il sale corrispondente.

L'acido è utilizzato nelle plastiche, vernici e resine acriliche. È commercializzato in due livelli di purezza: industriale e altamente puro.

ACIDO GLUCONICO

L'acido gluconico è un prodotto terminale di ossidazione totale del glucosio, è ottenuto attraverso l'*Aspergillus niger* se messo in condizioni particolari.

L'acido gluconico è in grado di ciclizzare e dare luogo ad un estere, il delta-lattone, che viene poi successivamente aperto dal microrganismo dando acido gluconico.

Le reazioni sono diverse a seconda del microrganismo usato: l'*Aspergillus* ossida il glucosio formando il lattone mentre il *gluconobacter* trasforma il glucosio direttamente in acido gluconico.

Reattore aerato, T intorno ai 30°C e stretto controllo del pH, necessario perché durante la fase di fermentazione i prodotti tendono a cristallizzare e anche il substrato di partenza (il glucosio) tende a cristallizzare proprio perché presente in grandi conc → pH va controllato. Faccio fermentazione batch a pH 6.5

Alla fine della fermentazione possiamo ottenere o l'acido gluconico direttamente oppure possiamo cristallizzare il delta lattone (controllore di acidità e conservante) perché entrambi hanno applicazioni industriali.

Il delta lattone è addizionato anche ai mangimi degli animali perché ha effetti benefici oppure viene usato nell'industria casearia per favorire la formazione della cagliata.

I sali dell'acido gluconico hanno le più svariate applicazioni come detergente, per eliminare ruggine, in metallurgia, additivi di cementi ecc.

Li uso come agenti chelanti, molecole in grado di intrappolare ioni, utilizzati nei prodotti della detergenza.

Prima si usava l'EDTA ma è stato sostituito con l'acido gluconico perché questo viene degradato con molta rapidità durante la fase di trattamento dell'acqua → chelante più green.

APPLICAZIONI ENZIMATICHE

Le applicazioni enzimatiche per applicazioni industriali sono le più svariate, buona parte sono relative all'industria alimentare, farmaceutica e anche un po' con l'industria cosmetica.

Aromi e profumi possono essere fatti tramite enzimi, sono usati anche nel campo della detergenza.

Usati anche nella produzione del biofuel, prodotti per la pulizia, abbigliamento. Applicazioni dirette o indirette.

L'utilizzo di enzima è andato via via crescendo perché sono aumentate le conoscenze ed è stato possibile capire come usarli. Anche il DNA technology ha aiutato in quanto è stato utilizzato per modificare specificità del substrato e ha aumentato la resa delle reazioni catalizzate da enzimi.

L'enzima è considerato environmental friendly, ha una produzione considerata più green rispetto ad altre.

DETERGENZA

Il primo episodio in cui gli enzimi sono stati utilizzati in campo detergenza risale al 1913, si resero conto che i fluidi presi dal pancreas addizionati ai detergenti lavavano e toglievano il grasso meglio.

Negli anni 60 vennero isolate le prime proteasi alcaline. A partire da qui non ci sono stati più detergenti che non

avessero avuto al loro interno un'enzima, adesso ce ne sono tantissimi dentro.

L'effetto degli enzimi è anche quello di abbassare le T di lavaggio, con conseguente risparmio nel consumo di energia, quindi l'utilizzo di enzimi consente T più basse e tempi di lavaggio più brevi.

Tuttavia gli enzimi devono mantenere la loro attività anche a 60°C.

Sono tutti enzimi non immobilizzati. Mercato enorme: gli enzimi detergenti devono essere economici e sicuri da usare.

La maggior parte sono derivati da organismi geneticamente modificati (per favorire magari la produzione di un certo enzima, non per forza OGM).

Non si usano mai gli organismi naturali perché non sarebbero in grado di soddisfare le richieste.

Bisogna fare in modo che l'enzima sia escreto nel brodo di fermentazione in questo modo dovrò purificare meno.

Questi sono enzimi non particolarmente sensibili per cui possono essere un po' trattati.

Dopo la fermentazione l'enzima viene recuperato dal brodo mediante rimozione delle cellule e di altri particolati con centrifugazione o filtrazione.

La maggior parte degli enzimi utilizzati oggi nei detergenti: idrolasi, proteasi, amilasi, lipasi, cellulasi e perossidasi.

Solo la serin proteasi può essere utilizzata nelle formulazioni detergenti: le tiol proteasi verrebbero ossidate dagli agenti sbiancanti e le metalloproteasi perderebbero i loro cofattori metallici a causa della complessazione con gli agenti di addolcimento dell'acqua o gli ioni idrossile.

I detersivi sono dei prodotti di formulazione raffinata perché devono avere dentro un sacco di componenti di varia natura. Gli enzimi lavorano in ambiente acquoso. I detergenti non sono utilizzati subito perché subiranno un processo di vendita per cui gli enzimi devono essere protetti e devono rimanere inattivi fino al loro momento di utilizzo.

Per esempio vengono bloccati togliendo gli ioni necessari all'enzima per attivarsi.

Dopodiché lo ione lo vincoliamo ad un sale e nel momento in cui mettiamo tutto nell'acqua si rompe il legame tra ione e sequestrante (vi era un legame non forti) e lo ione va nel sito dell'enzima attivandolo.

Lo sporco include proteine, grassi e molecole che devono essere rimosse a seguito dell'operazione di detergenza.

Data la conoscenza delle molecole che costituiscono lo sporco e data la conoscenza degli enzimi in grado di degradarle è stata studiata questa direzione verso la detergenza.

Si calcola la capacità di quel detergente di pulire fissate determinate condizioni operative.

All'aumentare della conc di enzima aumenta la capacità di pulire. Il detersivo liquido è un po' meno efficace del detersivo in polvere perché è più difficile inattivare l'enzima in quanto è presente molta acqua.

Si va a vedere come gli enzimi presenti sono in grado di degradare in parti più piccole le molecole più grandi dopodiché l'effetto sinergico deriva dal fatto che ci sarà un altro enzima in grado di attaccare proprio le parti più piccole.

FOOD PROCESSING

Si usano enzimi ovunque; gli enzimi sono stati usati per il pane, fermentazione alcolica, formaggio ecc.

Queste categorie di enzimi erano principalmente prodotti per estrazione da cellule o animali.

La grande maggioranza degli enzimi microbici industriali deriva da pochissime specie GRAS (generally recognized as safe) di microrganismi utilizzati per produzione enzimatica. I microrganismi predominanti utilizzati per la produzione di enzimi a fini alimentari sono: gli *Aspergillus*, i *Bacillus* e i *Kluyveromyces* (lieviti).

Sono microrganismi riconosciuti come sicuri, quindi nella produzione di enzima questa categoria di microrganismi ci assicura una produzione sicura senza sviluppo di eventuali tossine.

Sono enzimi contenuti all'interno degli alimenti che vengono anche estratti affinché possano essere usati per applicazioni. Siccome questi enzimi sono mediamente enzimi degradativi, uno dei problemi quando trattiamo con sostanze fresche e alimentari è legato alla disattivazione enzimatica in quanto questa è necessaria per mantenere l'alimento il più lungo possibile commerciale.

La commercialità non è legata soltanto al fatto che faccia bene o male ma è legata alle caratteristiche organolettiche.

I polifenoli hanno come obiettivo quello di rallentare l'effetto ossidativo dovuto all'ambiente, ciò che è prezioso nel caso della frutta sono i semi → nel caso della banana ciò che deve essere protetto è la polpa che contiene i semi.

Quindi la buccia si ossida per prima per preservare ciò che c'è all'interno, questo effetto è legato agli enzimi che catalizzano le redox delle molecole contenute nella buccia.

Ci sono anche enzimi che degradano una serie di molecole che invece vorremo preservare nel momento in cui andiamo a trattare gli alimenti.

Obiettivo dal punto di vista industriale è se mi servono di estrarre gli enzimi e usarli ma se non serve di disattivarli.

Mediamente si preferisce lavorare con enzimi immobilizzati piuttosto che liberi per le rese migliori, perché probabilmente il sito attivo si è stabilizzato, e perché spesso forniscono anche vantaggi di processo. Inoltre, la dimensione dell'impianto è di due ordini di grandezza inferiore a quella richiesta per i processi che utilizzano enzimi liberi.

Per disattivare un'enzima vado a pensare alle sue cond operative, essendo un'enzima proveniente da un microrganismo dovrebbe operare a cond ambienti e controllo anche il pH.

Per inattivarli si modifica o la T, si fa blanching ossia si sbollenta a 70-100°C in modo tale da disattivare tutti gli enzimi e poi si surgelano, il problema della T è legato al problema del mantenimento delle proprietà del cibo, oppure si modifica il pH perché ogni enzima ha un pH di esercizio e noi cerchiamo di metterli fuori da questo range o ancora si fa freezing partendo dai 7°C.

L'enzima immobilizzato è spesso un processo più economico dell'enzima libero perché si ha un uso più efficiente del substrato e riduzione del costo dell'enzima e del suo lavoro.

Le prime applicazioni di enzimi immobilizzati in campo alimentare sono stati i trattamenti di miscele racemiche di amminoacidi per andare a selezionare l'enantiomero corretto che è quello in grado di essere riconosciuto dai nostri enzimi. In questa applicazione si fa operazione di protezione di gruppo funzionale, si fa reagire questo in modo tale che il gruppo funzionale diventi un'altra cosa perché il problema è che spesso le reazioni che facciamo possono funzionare su più gruppi funzionali e quindi proteggiamo il gruppo funzionale facendogli una reazione; ciò che poi abbiamo generato deve essere facilmente rimosso per ripristinare la situazione.

Dopodiché si va avanti con il processo fino ad ottenere la mix racemica.

L'ultimo passaggio è fatto con l'enzima immobilizzato che è in grado di separare i due enantiomeri e trasformare quell'oggetto in un enantiomero che ricicleremo in colonna.

Si richiede l'uso di enzimi per ottenere i succhi di frutta per compressione.

Il problema è industriale, nel momento in cui dobbiamo produrre i succhi l'obiettivo è massimizzare la quantità di succo che vogliamo estrarre dalla frutta. Uno dei modi è la centrifuga ma costa moltissimo perché ciò che vogliamo trattare è tanto, dobbiamo avere la centrifuga giusta ed è batch → costi elevati.

Allora si fa smashing ossia si cerca di ammorzare la frutta per P cercando di spremere il succo dalla frutta.

Il problema è che quando spremiamo siamo in presenza di tutto (polpa, buccia); nella buccia e soprattutto nella parete cellulare della frutta ci sono un sacco di polisaccaridi pieni di pectina.

Le **pectine** sono usate per dare consistenza alle marmellate oppure per regolare la scorrevolezza delle paste dei prodotti da forno, sono usate in molte applicazioni (non solo alimentari).

Possiamo decidere di separare la pectina e poi utilizzarla e venderla oppure di lasciarla all'interno del succo, il problema è che i prodotti sono molto poco solubili e molto spesso si aggregano tra di loro nella fase di spremitura formando un gel che trattiene il succo e quindi non lo si riesce a spremere fuori e ad avere rese alte.

Usiamo allora enzimi proteolitici (come la pectinasi) in grado di reagire con le pectine e con i polisaccaridi per una spremitura migliore; il pretrattamento con la pectinasi agisce principalmente sulla parete cellulare, rompendo la struttura e liberando il succo.

Le pectinasi commerciali provengono da ceppi di *Aspergillus*, gli enzimi sono purificati e concentrati. Le pectinasi sono definite e classificate in base alla loro azione nei confronti della pectina, si distinguono due gruppi: pectinesterasi e pectina depolimerasi.

Il fatto di usare enzimi ci aiuta ad avere la giusta reologia del sistema (tanto più una cosa è liquida e tanto è più difficile pressarla), gli enzimi quindi da una parte impediscono che si formi un gel che trattiene il succo mentre dall'altra fanno in modo che otteniamo una reologia giusta di questa pasta di frutta ottenuta tale per cui l'operazione di spremitura è più efficiente. In particolare l'idrolisi della protopectina che lega le cellule indebolisce il tessuto del frutto, provocando la dissoluzione della protopectina aumentando così la viscosità del succo.

La degradazione di un polisaccaride è complessa e va per step successivi.

La rapidasi mi indica il rapporto tra gli enzimi, la polpa reagisce con la rapidasi e dopodiché abbiamo la compressione. L'enzima una volta fatto il suo dovere si inattiva e rimane nel succo (non fanno male, ovviamente ho fatto i controlli sull'enzima prima della produzione).

Le rapidasi possono essere enzimi prodotti da microrganismi le cui molecole prodotte sono state dimostrate non dare luogo a tossicità e allergie. Bastano 25 g/ton di rapidasi.

Si può fare poi lo stesso succo di frutta separando la pectasi, lo si fa con due rapidasi diverse in due step diversi.

Non facciamo sterilizzazione ma pastorizzazione perché degraderei le proteine presenti e le caratteristiche nutritive del succo. La pastorizzazione non garantisce asepsi.

Lo scarto quindi il solido NON si butta, viene trasformato e poi viene usato per addizionarlo ai mangimi degli animali, non è consentito per gli umani in quanto ci sono regole più stringenti.

Un'altra produzione enzimatica è la produzione degli sciroppi, è un modo per trattare amidi per ottenere principalmente dolcificanti (qualsiasi cosa che sia in grado di rendere dolce).

I dolcificanti in forma di sciroppo hanno una grandissima produzione industriale.

Gli sciroppi hanno tagli di zucchero diversi, questi tagli sono ottenuti a seconda dell'enzima utilizzato.

Il polisaccaride che è l'amido è proprio tagliato per avere tagli diversi.

Questi sciroppi sono il risultato di taglio di lunghe catene per cui possiamo avere gradi di dolcezza diverse, abbiamo anche risposte alla cottura diverse coprendo così l'industria di prodotti da forno. Siccome sono polimeri hanno proprietà reologiche quindi allo stesso tempo fanno da dolcificanti e da modulatori di viscosità. Gli sciroppi ad alto contenuto di fruttosio sono prodotti essenzialmente a partire dagli scarti di mais (che lo si usa per fare l'olio). Alcuni degli enzimi usati restano all'interno dello sciroppo mentre altri siccome più costosi sono usati in forma immobilizzata.

Partiamo dall'amido, ammolliamo con acqua solitamente con acidi in modo da rompere il chicco, dopodiché operazione con vapore, poi liquefazione (man mano che taglio il polisaccaride la viscosità del sistema è sempre più bassa), trasformo quindi qualcosa che era solido in un liquido (mi fermerò al livello di mio interesse).

Poi operazione di saccarificazione per ottenere gli zuccheri che o rimangono sotto forma di sciroppo oppure andando avanti è possibile ottenerli tramite separazione di un solido.

Ciò che richiede il mercato è il destrosio equivalente ossia ciò che dà il potere dolcificante allo sciroppo.

Il destrosio equivalente indica il grado di idrolisi e esprime il potere riducente in percentuale di destrosio puro.

Per fare l'operazione di liquefazione si può operare in continuo (grande vantaggio), si usa un' α -amilasi e ciò che esce dalla liquefazione va in un impianto da cui otteniamo le destrine e in seguito ad un processo otteniamo i monomeri.

Per la liquefazione usiamo reattori a serbatoio agitato, reattori a serbatoio agitato continuo (CSTR) o un fornello a getto.

Produzione di sciroppi ad alto contenuto di fruttosio e di aspartame, sono due produzioni, soprattutto quella dell'aspartame, smart. Nascono dalla necessità di sostituire il saccarosio (zucchero) e questa necessità nasce da un problema di tipo dietetico e diabetico.

La saccarina è un prodotto solo di sintesi, è stato il primo dolcificante utilizzato in modo alternativo allo zucchero.

La saccarina non dà problemi legati all'insulina, è stata usata per molti anni ma attualmente non si usa molto perché ha un retrogusto ed è termostabile ma non fino alle T di cottura dei prodotti da forno.

Questo problema è stato risolto con l'aspartame, dimero con due amminoacidi cuciti assieme per via enzimatica, oppure dal sucralosio; quest'ultimo ha il vantaggio di essere dolce ma non è assolutamente metabolizzabile dal nostro organismo quindi entra e va.

L'altro vantaggio è che sono sempre molto più dolci del saccarosio per cui se ne usano di meno.

Ad esempio il fruttosio di per sé ha calorie ma siccome è tanto più dolce se ne mette molto di meno.

Il grado di dolcezza è stabilito dagli esseri umani.

Gli zuccheri che sono in grado di sostituire il saccarosio vanno verso la direzione di diminuire le calorie.

Sciroppo ad alto contenuto di fruttosio:

Reazione fondamentale è la reazione di isomerizzazione, questa deve essere fatta di per sé su qualsiasi fonte di glucosio. Processo un po' complesso perché si parte dagli scarti di mais, scarti che sono polisaccaridi.

Ci dovranno essere dei controllori di T e pH. Il problema è legato proprio alla T, gli zuccheri a T troppo elevate si degradano e quindi dobbiamo preservarli però se lavoriamo a T troppo basse abbiamo rischio di infezione.

Si cerca di evitare infezioni microbiche, si tiene la T un po' più alta consapevoli che un po' di zucchero degraderà e con tempi di contatto bassi → preserviamo enzima per tempi lunghi ed evitiamo degradazione del prodotto con limiti delle infezioni.

Partiamo dall'amido, facciamo una sospensione di amido, trattiamo a valori di pH 6.5, trattiamo con un'iniezione di α -amilasi in presenza di vapore e T di 105°C, l' α -amilasi si degrada con rapidità esagerata e con tempi di 5-7 minuti, poi

facciamo l'operazione di maltazione ottenendo il maltosio e al tempo stesso preserviamo le caratteristiche del prodotto che poi manderemo al reattore successivo.

L' α -amilasi è un'enzima molto comune quindi poco costoso, conviene usarlo in forma libera.

Nello step della liquefazione le alte T rompono i granuli di amido rendendo più accessibili le catene di amilosio e amilopeptina.

Al reattore n°2 usiamo un amiloglucosidasi che è in grado di tagliare il maltosio generando singole molecole di glucosio, T e pH più bassi (T=95°C e pH 4.5) ma tempi di contatto sempre rapidi.

L'amiloglucosidasi ha un pH ottimale di 6.5 ma questo viene abbassato per consentire reazioni cinetiche più veloci.

Enzima usato anche qui in forma libera e che rimane quindi nel prodotto. Il glucosio dopodiché viene mandato in cascata (stiamo lavorando in continuo e in cascata) per fare il fruttosio, usiamo questa volta un'enzima immobilizzato: il glucosio isomerasi.

Vantaggio dato dai recuperi termici, vanno nella direzione dell'abbassamento dei costi perché ad esempio il calore mi serve per fare il vapore. Nel caso dei processi biotec i recuperi termici non sono molto frequenti perché il salto termico è piccolino.

Abbiamo tanti batch in continuo che fanno diventare il processo continuo.

Non dobbiamo fare sviluppo dell'inoculo e semina.

Quindi il primo step è fatto con l' α -amilasi e quello successivo è quello di saccarificazione, qui le reazioni devono essere sufficientemente veloci perché i tempi lunghi portano alla caramellizzazione degli zuccheri dando luogo a perdita di prodotto e formazione di impurità. È lo step che taglia il dimero e ci porta agli zuccheri.

Il maggior punto di infezione è qui perché il glucosio è la fonte primaria di qualsiasi microrganismo.

Dopodiché si fa lo step di isomerizzazione che viene fatto normalmente dai batteri. I microrganismi sono in grado di trasformare glucosio in fruttosio, l'isomerasi usato è immobilizzato ed è abbastanza resistente alla denaturazione.

È però sicuramente l'enzima più delicato rispetto agli altri due. L'enzima è immobilizzato reticolandolo a glutaraldeide o in un veicolo inerte dopo che è stato rilasciato dalla cellula batterica.

Le cond operative dell'isomerizzazione sono T di 60°C, più alte rispetto a quelle convenzionali dell'enzima e pH 7.

Il problema di questo step è che il glucosio e il fruttosio sono instabili a queste condizioni e quindi possono decomporsi ad acidi organici e altri prodotti. In condizioni industriali la reazione è leggermente endotermica.

Per aumentare la resa della reazione è necessaria la presenza di una certa conc di magnesio perché funge da attivatore e stabilizzatore dell'enzima.

Bisogna poi limitare la quantità di ioni calcio presenti poiché disattivanti rispetto all'enzima perché si sostituiscono al sito dell'enzima. Per garantire delle rese bisogna quindi mantenere costante conc di Mg e togliere Ca.

L'isomerizzazione si opera in reattori a letto fisso in continuo, gli enzimi sono così duri da prevenire la compattazione e l'intasamento del letto.

Problema: l'enzima decade nel tempo. L'enzima non muta, tutt'al più si degrada.

Durante il funzionamento, l'enzima immobilizzato perde attività.

Mediamente l'enzima è in grado di sostenere un processo continuo di circa 200 giorni (produzione totale acido citrico dura 1 settimana, produzione di lievito dura 2-3 giorni, quindi 200 giorni sono un tempo lungo).

Si lascia l'enzima nel reattore finché non arriva al 12% della sua attività, a quel punto si stoppa la produzione perché non è più conveniente, si sostituisce il catalizzatore e si riprende.

Il nostro obiettivo è una produzione costante cioè la concentrazione di prodotto deve essere sempre la stessa.

Per mantenere una concentrazione costante di fruttosio nello sciroppo del prodotto, la velocità del flusso di alimentazione viene regolata in base all'attività effettiva dell'enzima.

Processo di arricchimento: riusciamo ad ottenere mix a 42% di fruttosio ma il mercato lo richiede al 55%.

Si prende quindi parte del prodotto, lo si manda ad una colonna cromatografica e si separa glucosio e fruttosio.

La colonna ha affinità diverse per glucosio e fruttosio per cui il prodotto viene ripartito tra la fase stazionaria e quella mobile, la ripartizione dipende poi dagli equilibri.

La molecola con più affinità con la fase mobile va via mentre l'altra rimane un po' di più dentro alla colonna.

Abbiamo quindi separazione dei due prodotti, una corrente fatta da glucosio mentre l'altra da fruttosio puro.

Prendiamo il fruttosio e facciamo una miscelazione con lo sciroppo con fruttosio al 42% fino ad ottenere il 55%.

Con il glucosio invece facciamo riciclo, torna al reattore di isomerizzazione e si fa isomerizzare e via così.

Produzione di aspartame

L'aspartame è l'insieme di due amminoacidi cuciti assieme attraverso un processo di produzione enzimatica.

L'enzima che fa la cucitura è una proteasi quindi è in realtà un'enzima che in teoria degraderebbe le proteine.

Le proteasi sono in grado di catalizzare sia la reazione diretta che inversa, tendono a catalizzare di più la reazione degradativa ma riescono a fare anche quella di sintesi, questo perché agiscono sul legame peptidico.

Esistono due molecole di aspartame, e in base alla conformazione e geometria della molecola abbiamo un aspartame dolce ed uno amaro.

La termolisina è un'enzima che tenderebbe a degradarsi, la sintesi dell'enzima è legata all'equilibrio di formazione e di degradazione. Il catalizzatore catalizza più volentieri la reazione di degradazione → dobbiamo spostare equilibrio.

Lo faccio sottraendo prodotto man mano che sto facendo la reazione.

Nella chimica industriale possiamo distillare ma qui avendo molecole biologiche rischiamo di degradare la molecola.

Si sfrutta allora Le Chatelier all'interno della reazione: abbiamo L-amminoacido in cui abbiamo protetto il gruppo amminico in modo da preservarlo e lo facciamo reagire con il metil estere racemo di fenilalanina (prendiamo sia L che D), il vantaggio è che la termolisina fa reagire e cuce assieme i due anelli dopodiché questi formando due prodotti di cui un addotto (c'è un'interazione tra la molecola dei due amminoacidi che ho cucito assieme e l'isomero D, non è stabile l'addotto) e questo si separa dall'ambiente di reazione → applichiamo le Chatelier in situ perché tolgo l'addotto quindi tolgo un prodotto.

Trattiamo, rimuoviamo l'isomero D, liberiamo il gruppo protetto e otteniamo l'aspartame.

L'isomero D non viene buttato ma lo trasformo di nuovo in D-L racemizzandolo e lo ricicliamo.

Altra grossa applicazione degli enzimi sono gli enzimi utilizzati nella produzione da forno.

Lo metto per degradare gli amidi contenuti nella farina. Alcune farine contengono già degli enzimi degradativi che predispongono il risultato per la lievitazione. Sono enzimi amilolitici che vanno a degradare una serie di polisaccaridi.

Gli enzimi amilolitici scompongono l'amido della farina in piccole destrine che diventano substrati migliori su cui il lievito può agire nel processo di panificazione.

La degradazione dei polisaccaridi porterà a prodotti diversi con caratteristiche organolettiche diverse.

Ogni enzima ha il suo substrato caratteristico, a seconda di come voglio tagliare il polimero sceglierò il catalizzatore (o più di uno) ottimale.

Glucosio ossidasi, enzima in grado di ossidare il glucosio fino ad acido gluconico. Reazione che porta a delle caratteristiche organolettiche che sono richieste dal mercato come la texture, consistenza ecc.

L'effetto di aumento di elasticità e di consistenza può essere ottenuto in Europa solo tramite questa reazione.

Si potrebbe idealmente usare il bromato di potassio ma in Europa è proibito perché è un sospetto cancerogeno.

Le proteasi sono in grado di abbattere le molecole proteiche nell'impasto e quindi di degradare il glutine, sono per esempio utilizzati per fare prodotti gluten free.

L'asparagina più glucosio formano ad alte T l'acrilammide, molecola potenzialmente tossica e quindi da evitare nei prodotti da forno; per fare ciò si fa reagire l'asparagina con l'asparaginasi trasformandola in acido aspartico.

Enzimi molto utilizzati nell'industria casearia con obiettivo prodotti caseari con caratteristiche organolettiche diverse.

Un tempo questi enzimi erano estratti da animali ma ora vengono prodotti per via batteriologica, in questo caso specifico si è fatta una pesante operazione di modificazione genetica dei batteri/funghi in modo da inserire l'informazione genetica e di far sovra produrre gli enzimi desiderati.

Ad esempio la lattasi è usata per gli individui torrenti al lattosio.

Lipasi, enzimi per degradare i grassi, possono essere fungine o batteriche; trasformano il grasso, obiettivo avere caratteristiche organolettiche desiderate.

Le lipasi vengono utilizzate per scomporre i grassi del latte e conferire sapori caratteristici ai formaggi.

C'è anche il lisozima, enzima antimicrobico in grado di degradare la parete cellulare, viene addizionata per evitare la formazione di batteri e muffe nei prodotti conservati.

Produzione di aromi e fragranze

Aromi riguarda tutto ciò che percepiamo attraverso il gusto, fragranze invece tramite olfatto.

Le sostanze chimiche di sapore e aroma sono molecole eccezionalmente bioattive che esercitano il loro gusto molto caratteristico anche a concentrazioni molto basse a causa dell'elevata interazione selettiva con i recettori.

Molti aromi e gusti sono prodotti naturalmente negli alimenti dall'azione di enzimi e/o da microrganismi naturali. Possiamo distinguere tra sostanze aromatizzanti naturali e sostanze aromatizzanti identiche a quelle naturali, le prime sono materiali ottenuti mediante processi fisici appropriati (come l'estrazione con solvente) e processi enzimatici o microbiologici da materiale di origine vegetale o animale mentre le seconde sono materiali ottenuti per sintesi chimica e sono chimicamente identici ad una sostanza naturalmente presente nei vegetali o animali.

Esempio: l'aroma di vaniglia non è necessariamente estratto ma magari è prodotto con un processo di sintesi.

L'uso di enzimi nella sintesi degli aromi consente l'ottenimento di composti che potrebbero essere etichettati come naturali quando vengono utilizzati substrati di origine naturale.

La conversione enzimatica inoltre consente il raggiungimento di elevate produttività di composti aromatici rispetto all'estrazione diretta dalle piante.

Abbiamo quindi una grande produzione enzimatica; l'unica limitazione è legata al fatto che gli enzimi devono derivare non da microrganismi ma da sostanze naturali.

Vogliamo produrre aromi a bassa intensità, alta intensità e esaltatori di gusto.

Aromi a bassa intensità come sciroppo ad alto contenuto di fruttosio oppure acido citrico, aromi a intensità alta come il metilchetone che ha gusto di gorgonzola e poi ci sono gli esaltatori di gusto e sapidità come il glutammato di sodio, grande applicazione perché usato molto in Asia come additivo per la salsa di soia.

Sindrome da ristorante cinese → eccesso glutammato di sodio, alcune persone sono più sensibili rispetto ad altre.

I processi tradizionali sono solitamente processi estrattivi, sono usati per la birra, vino, formaggio, yogurt e salsa di soia.

Enzimi utilizzati anche nell'ambito farmaceutico, per esempio le penicilline G e V sono prodotte per fermentazione e sono i precursori di base di un'ampia gamma di antibiotici semi-sintetici come l'ampicillina.

Attualmente la penicillina G non si fa più a scopo antibiotico ma lo si fa per ricavare l'anello β -lattamico

Applicazione: biosensori

Molte reazioni enzimatiche catalizzate sono esotermiche, generando calore che può essere utilizzato come base per misurare la velocità di reazione e quindi la concentrazione dell'analita.

Questo rappresenta il tipo di biosensore più generalmente applicabile: si misura il ΔH tra l'interazione dell'enzima e la molecola che è enzimata. In tali condizioni strettamente controllate, fino all'80% del calore generato nella reazione può essere registrato come variazione di T, riusciamo così a calcolare il ΔH , grazie anche alle dimensioni dell'oggetto.

Applicazione: bio-fuel cells

Una fuel cells è un dispositivo elettrochimico che è in grado di trasformare ciò che deve essere trasformato in elettricità tramite una reazione elettrochimica. Una delle proposte fatte è stata utilizzare enzimi come catalizzatori, su anodo e catodo quindi sono stati immobilizzati degli enzimi.

SINGLE CELL PROTEINS (SCP)

È un sottoprodotto di altri tipi di processi di fermentazione che per esempio servono a degradare rifiuti principalmente agricoli con obiettivo abbattimento carica dei rifiuti e con produzione di molecole ossia single cell proteins.

Quando si parla di single cell proteins si intende un organismo cresciuto e coltivato a scopo principalmente proteico, da una parte si degradano scarti e dall'altra si produce l'organismo che può o essere mangiato dall'uomo/animali oppure viene proprio usato come pacchetto proteico quindi coltivo l'organismo, lo apro e recupero poi proteine e quindi recupero amminoacidi e integratori oppure utilizzo gli amminoacidi come sintoni cioè come molecole di partenza su cui posso effettuare una serie di reazioni. Non sempre ciò che si coltiva è unicellulare.

Questo tipo di produzione ha preso piede come modo per degradare scarti di varia natura, agricoli ma anche industriali. Per esempio esistono dei microrganismi che possono crescere su normal-alcanti o su metano e questo fu visto nell'ottica di usare normal-alcanti con obiettivo recuperare proteine dall'organismo.

Problema: ci sono degli amminoacidi che noi non siamo in grado di sintetizzare quindi siamo costretti a introdurli attraverso la dieta mentre gli organismi più semplici/batteri sono in grado di farlo e quindi si coltivano questi organismi in modo tale da far produrre a loro gli amminoacidi e di mangiarceli, questa è una cosa che facciamo già perché quando componiamo il nostro pasto stiamo già facendo quest'operazione.

La distribuzione delle proteine che vien assunta normalmente non è uguale per tutti, ha una connotazione religiosa, geografica, sociale (paesi poveri introducono meno proteine rispetto ad altri) → problema che deve essere affrontato. Le single cell proteins furono sviluppate verso la metà degli anni 60 attraverso un processo che fu sviluppato in Inghilterra. Negli anni del boom economico la popolazione crebbe esponenzialmente, venendo dallo spettro della fame quel che accade è che ci fu un momento di panico legato al fatto che si pensò che non c'era cibo sufficiente. Allora si cercò una fonte di proteina di basso costo e di grandissima produzione e che magari si potesse utilizzare una fonte di scambio (questa proteina deve essere competitiva con le altre forme di proteine convenzionate). Questo fu l'incipit che portò ad andare nella direzione dell'utilizzo di microrganismi unicellulari, piante, batteri, lieviti o alghe. I microrganismi come lieviti e batteri hanno un tempo di raddoppiamento normalmente compreso tra 5-15 minuti mentre le muffe e alghe lo hanno di 2-4 h. Rispetto alle piante producono la stessa quantità di proteine in spazi molto piccoli, con alta velocità. Attualmente in realtà le SCP sono un prodotto di nicchia, vanno ad impattare sull'alimentazione di tipo vegetariana/vegana perché non contengono alcuna proteina animale, sono proteine principalmente vegetali (oppure batteriche). Vanno ad impattare anche sulle persone che per esempio hanno problemi di colesterolo (perché non essendo di origine animale non comporta questo tipo di problema) e su aspetti di alimentazione legati ad aspetti religiosi. Si scelsero batteri, lieviti e alghe come microrganismi per fare le SCP perché è possibile avere un grande numero di generazioni in un n° corto di ore → fondamentale quando vogliamo fare produzione di grande impatto. In questo momento specifico storico la richiesta non è questa ma all'inizio era nata con un altro scopo.

Ipotizziamo un processo batch utilizzando un microrganismo che cresce alla 2^n con $n = n^\circ$ generazioni, supponiamo di avere un tempo di raddoppiamento di 1 h e di decidere che il batch duri 48h. Dopodiché ci confrontiamo con le necessità del mercato e queste ci dicono che una massa secca di una cellula è di 10 g di cui 50% proteine e che un uomo medio ha bisogno di circa 70 g di proteine al giorno. Quindi con una fermentazione di 48h riusciamo a fornire il pasto ad un essere umano per 200 giorni. Questo tipo di fermentazione è condotta aerobia a meno che non serva degradare lo scarto tipo il siero di latte; in questo caso fermentazione anaerobia perché lo si vuole degradare per ottenere una serie di prodotti e non si vuole sfamare la popolazione. Le fermentazioni aerobie sono più veloci. Il discorso del continuo in questo caso potrebbe avere senso ma il problema sono le mutazioni. Anche quando sarebbe preferibile un processo continuo tipo grande produzione in realtà il continuo non si fa. Il microrganismo viene aggiunto nel processo continuo solo una volta, si fa solo un inoculo all'inizio e poi si inizia ad esercire il sistema, fornisco del tempo al microrganismo per riprodursi e ad un certo punto troverò nel reattore solo substrato → condizione da evitare (problema). Il tempo di residenza è medio perché nessuno ci garantisce che il primo microrganismo che abbiamo messo assieme sia il primo ad essere estratto. Processo continuo qui autorizzato perché ci sono poche mutazioni, la continuità vale 2-3 mesi nei casi dei processi biotecnologici (rispetto alle 48-72 h del batch). Dal punto di vista del mercato se stiamo producendo SCP la quantità (essendo di nicchia) non va nelle condizioni di un processo continuo, andrebbe bene anche un processo batch. Si può fare processo continuo quando il prodotto è associato rigorosamente alla crescita (se il prodotto è il microrganismo lui è associato alla crescita). Nel caso del lievito di panificazione la richiesta è grande, quantità piccoline se a scopo proteico (SCP) e quantità molto grande se proprio per il lievito. È fatto però a batch anche se la richiesta direbbe di fare un processo continuo solo che qui intervengono le mutazioni → cambierebbe molto il prodotto. Produzione del microrganismo fatto in maniera controllata e questo non è possibile con il processo continuo. Tracciabilità caratteristica che deve essere rispettata, nel processo continuo la tracciabilità non è possibile, quindi i processi batch la fanno a padrone.

Nel caso del SCP il processo continuo è autorizzato, una delle poche applicazioni.

Se la produzione delle SCP ha obiettivo proteina (cioè produco microrganismo, lo tiro fuori dal reattore e lo apro) il processo continuo ha il vantaggio di produrre di più a bassi costi. Se invece la sto facendo per trasformare il prodotto aggiungendolo allora in quel caso il processo continuo non è autorizzato perché non c'è tracciabilità.

Le SCP non possono essere mangiate così come sono e questo è uno dei motivi per cui si ha abbandonato l'idea di cibo massivo. Se stiamo mangiando un batterio lui non contiene soltanto proteine ma contiene anche acidi nucleici,

problema perché non siamo in grado di degradarlo quindi rimangono all'interno e mangiandone in eccesso questi si accumulano in forma di sali nelle giunture e possono provocare la gotta e l'artrite.

Massimo 15 g di lievito al giorno per gli umani. Nel caso dei batteri e lieviti il contenuto di acidi nucleici è più alto rispetto a funghi e alghe. Quindi se voglio mangiare batteri a scopo SCP dovrò degradare il prodotto ottenuto.

Quando si deve scegliere un organismo per un particolare processo produttivo ci sono una serie di fattori di crescita da essere considerati.

Vantaggio SCP: elevata resa del coefficiente di biomassa, tolleranza a range di pH e T alta.

Svantaggio SCP: bassa velocità di crescita perché quello che vogliamo fare è il microrganismo stesso, alta velocità di mutazione spontanea, bassa aerazione perché meno costi.

La crescita filamentosa è sia un vantaggio che uno svantaggio perché dal punto di vista di produzione è uno svantaggio in quanto devo agitare in maniera più difficile, le ife non vanno strappate perché altrimenti il microrganismo subisce problemi ma dal punto di vista della separazione è un vantaggio perché è più facile separare un organismo filamentoso → bisogna fare un bilancio tra le due cose.

Se a parità di produzione posso ottenere le stesse cose ma uno mi richiede meno ossigeno allora scelgo lui.

Basso pH ci aiuta nell'autosterilizzazione e autoaspepsi. In questo tipo di produzione l'asepsi è fondamentale perché il brodo di coltura che farò è un impasto appetibile ad un microrganismo aerobio che deve crescere in fretta, devo avere disponibile glucosio e quindi sto preparando un impasto su cui potrebbe crescere qualsiasi microrganismo ma io voglio SOLO il mio organismo scelto perché autorizzato dagli enti proposti.

Ciascun microrganismo ha il substrato preferito ma in generale un vantaggio del processo biologico è la flessibilità dei microrganismi per adattarsi a diverse materie prime.

I microrganismi vengono suddivisi se sono autotrofi o eterotrofi e in base alla fonte di C che usano.

Non sempre gli organismi sono in grado di degradare carboidrati complessi quindi a seconda della complessità del substrato (problema dei substrati lignocellulosici) esso può essere pretrattato per via fisica o chimica (costi diversi e la scelta dipenderà dal valore del microrganismo usato).

Il pretrattamento del substrato può avvenire per macinazione, ma quest'operazione richiede approssimativamente 1/3 dell'energia prodotta dal sistema, dobbiamo usare quindi molta energia e in più ci sono i costi dei macchinari.

Costi derivanti dall'uso di enzima, difficilmente sarà un'enzima immobilizzato.

Per bypassare questo problema della predigestione del substrato si fanno fermentazioni con simbionti cioè all'interno dello stesso sistema si mettono microrganismi diversi, se stiamo producendo SCP con obiettivo proteico questo non è un problema perché alla fine ammazzeremo tutto quel che è stato prodotto e li apriremo, ci saranno problemi legati magari ai sottoprodotti o eventuali tossine ma rispetto alla proteina e amminoacido non c'è problema.

Due microrganismi diversi, uno in grado di degradare il substrato e quindi farlo digerire meglio all'altro e i due simbionti stimolano l'un l'altro.

Diversamente si può fare fermentazione in serie, nel primo reattore metto un microrganismo in grado di degradare il substrato, il substrato degradato poi va nel secondo reattore e lì sopra ci coltivo e produco il microrganismo.

Si fa spesso quando il microrganismo è prodotto con obiettivo di degradare lo scarto e il prodotto è un sottoprodotto del processo.

La resa della biomassa dipende sostanzialmente da quanto il microrganismo sia in grado di sfruttare il processo in modo da produrre ATP e questo è un problema legato al metabolismo dell'organismo stesso. Ci saranno microrganismi più efficienti nella produzione di ATP e altri inefficienti. A parità di prodotto finale si sceglierà quello che è in grado di sfruttare meglio l'ATP e che non faccia vie parallele (vogliamo usare ATP proprio per crescere).

Alcuni organismi useranno ATP in modo efficiente e ci daranno rese maggiori mentre altri lo disperderanno nelle vie laterali → studiare metabolismo del microrganismo e poi fare scelta più adatta.

Nell'ambito del SCP possiamo trovare microrganismi autotrofi che hanno a che fare con CO₂ come substrato per crescere, possiamo trovare alghe e cianobatteri che sono microrganismi fotosintetici che utilizzano una fonte di C in partenza che è a basso costo poiché è anidride carbonica dell'aria.

Le alghe e soprattutto le spiruline sono utilizzate spesso a scopo recupero dei prodotti presenti al loro interno quindi vengono coltivate e poi trattate per ricavare proteine, amminoacidi, enzimi o altre sostanze; sono usate anche a scopo alimentare perché fanno parte di prodotti utilizzati da persone che non consumano carne.

La spirulina è un'alga sviluppata nel Sudamerica e viene prodotta usando la coltivazione a pond (coltivazioni lagunari), produzione semplice in cui ho grandi bacini di bassa profondità e ampia aria esposta affinché lo scambio del CO₂ dell'aria venga effettuato in modo efficiente e nei bacini ho gli organismi, si lascia che il processo segua un percorso naturale.

Molto spesso operazione effettuata all'aperto quindi nessun controllo dell'asepsi con poca formulazione del mezzo nutritivo, rimescolamento blando del sistema e tutt'al più aggiunta di nitrati per bilanciare quantità di N.

Si ottengono poi microrganismi, spesso filamentosi che possono essere rastrellati via e separati dalle acque in cui sono stati coltivati. L'acqua viene poi eliminata attraverso dei filtri a tamburo rotante e i microrganismi una volta fatti crescere vengono essiccati per venderli.

All'interno di questa tipologia di prodotto c'è il 56% di proteine e può essere venduta sia a scopo umano che animale. La composizione dal punto di vista proteico è abbastanza buona, non ha una concentrazione elevata di acidi nucleici (intorno al 4%) per cui sono usati anche per l'alimentazione umana.

Il metodo di separazione è piuttosto semplice perché metodo meccanico: rastrello gli organismi.

Per l'eliminazione delle acque e quindi la disidratazione (prima di un eventuale essiccamento) considerato il costo del prodotto finale e della massa da separare possiamo operare o per centrifugazione, flocculazione/flottazione o sedimentazione. Si utilizza principalmente un processo di flocculazione con idrossido di calcio poi seguito da un processo di trattamento in un sistema filtro tamburo rotante.

La centrifugazione non è favorita perché i costi energetici risulterebbero elevati.

Il problema legato alla produzione di SCP con questi materiali è la difficoltà della disponibilità di luce solare (in quanto organismi fotosintetici). La luce, perché il sistema sia efficiente e produttivo, deve essere mantenuta 24/24 e ciò è impossibile. La luce solare implica un basso costo energetico.

Quest'operazione può essere effettuata in latitudini in cui la luce solare è disponibile per lungo tempo nell'arco dell'anno → confini geografici.

Input energetico del sistema molto piccolo perché abbiamo piccole necessità di energia per il rimescolamento del brodo in modo che il tutto sia efficiente ma per quanto riguarda l'energia di irraggiamento non abbiamo costi e inoltre il substrato è CO₂ presente già nell'aria → costi a priori piuttosto ridotti.

La produttività globale però di questa produzione non è molto efficiente.

Produttività piccole per quanto riguarda i microrganismi però è comunque conveniente rispetto alle produzioni di proteine convenzionali, se confronto la quantità di proteina prodotta a partire da questo tipo di sostanza per ettaro di terra ci si rende conto che la produzione di proteine tramite alghe è elevata rispetto agli altri processi.

Dal punto di vista della produttività generale, rispetto ad altri tipi di processi di fermentazione non siamo in presenza di grandi produzioni. Uno dei punti chiave è legato alla CO₂ che deve essere dispensata in modo sufficiente e costante perché è il substrato e la fonte di C utilizzata da questi microrganismi e quindi è un fattore limitante (tanto più se l'alimentazione CO₂ è fatta in modo naturale). Uno dei modi per spingere queste produzioni è proprio quello di immettere CO₂ in modo forzato all'interno del processo. I reattori devono essere trasparenti e se sono fotobioreattori convenzionali quindi cilindrici e simili ai reattori delle fermentazioni, sono spesso montati in modo inclinato affinché in funzione dell'incidenza dei raggi luminosi vengano fatti ruotare in modo che la luce solare possa raggiungere tutta la biomassa; se siamo invece in presenza di reattori tubolari l'irraggiamento può essere fatto in modo non naturale e in modo forzato attraverso un sistema luminoso tale per cui si possano garantire le condizioni di luce nelle 24h aumentando così la produttività della biomassa. Produzione applicata spesso da alghe che hanno o scopo ad alimentazione umana/animale oppure materiale di partenza a scopo estrattivo.

Altre fonti di C che possono essere usate per le SCP sono diverse: carboidrati, quindi scarti derivati da produzione agricoli, alimentare oppure carboidrati che derivano dalla degradazione di polisaccaridi naturali come amidi o pectine oppure scarti lignocellulosi. Per substrati contenenti zuccheri complessi è necessario fare un pretrattamento, non se stiamo parlando di melasse perché già costituito da glucosio.

Questi scarti sono di basso costo. Le SCP devono essere competitive rispetto alle altre fonti proteiche che derivano da altri tipi di produzione come allevamento nel caso di carne o agricoltura nel caso dei vegetali.

Va considerato quindi il pretrattamento del substrato, considerazioni di vario tipo: si può passare da un trattamento idrolitico quindi con acidi o basi forti e un po' di calore da un trattamento con vapore e quindi con costi derivanti dall'utilizzo di vapore oppure da un trattamento legato all'uso di enzimi per scopo degradativo con costi maggiori.

Una volta prodotto l'organismo potrà utilizzarlo attraverso un processo di estrazione per ricavare proteine ecc altrimenti posso usarlo a scopo alimentazione se ho fatto i dovuti controlli.

Esempi:

1) Processo *Symba*, usato in Svezia, usato con obiettivo trattamento scarti dell'industria della patata.

Processo effettuato utilizzando due microrganismi simbiotici: un *saccharomycopsis fibuligera* e una *candida*, la prima è in grado di degradare gli amidi delle patate cosa che le *candide* (che sono dei lieviti) non sono in grado di fare.

Ciò che deriva dalla prima diventa substrato predigerito per la *candida* che finirà il processo di degradazione.

A questo punto lo scarto viene ad essere trattato ivi comprese le acque e i microrganismi usati vengono poi separati, seccati e venduti come SCP. Effetto: in 10 giorni riduzione della parte di scarto del 90% con produzione di SCP che contiene circa il 45% di proteine.

2) Processo *Norterm*, usato in Norvegia, in cui si utilizza un metilotrofo per far avvenire la fermentazione in cui il substrato è metano, in questo caso l'obiettivo è quello di evitare emissioni di metano nell'ambiente. Processo aerobio e continuo. Abbiamo abbattimento delle emissioni e al tempo stesso produzione di SCP con contenuto di proteina di circa il 70%, porta alla formazione di pronina usata a scopo alimentazione animale.

3) Processo *BP* dagli idrocarburi, questi sono fonti di C, e il BP usa la *candida* per degradare n-alcani, processo usato per gestire eventuali sversamenti oppure per gestire correnti.

Da una parte obiettivo principale è la degradazione degli scarti mentre dall'altra parte come sottoprodotto ho produzione di SCP che possono essere usate in modo vario. Circa 200000 t all'anno, viene usato poco in Europa, USA e Giappone, era molto usato nei paesi dell'ex unione sovietica con scopo alimentazione animale.

Problemi: (i) i n-alcani non sono facilmente solubili in acqua quindi vanno ridotti in goccioline e devono essere usati dei disperdenti in modo tale che possano essere confinati in acqua quindi vi è la presenza di surfattanti, molecole organiche, che potrebbero essere degradate dagli organismi e che potrebbero portare a modificazione del prodotto (ii) presenza dell'O₂, va alimentato sempre e fa parte di uno dei costi principali di produzione.

L'alta riduzione degli idrocarburi porta ad una richiesta di ossigeno molto alta che comporta due problemi: uno legato al costo (per assicurare un buon OTR opereremo una vigorosa agitazione e un uso di sovrappressione) e l'altro all'incremento di T.

La reazione di ossido riduzione è fortemente esotermica e dovendo raggiungere gradi di ossidazione più elevati l'aumento di T è molto alto comportando problemi di smaltimento di calore, presenze di camice, ecc.

Non possiamo fare recuperi termici perché il calore da smaltire è piccolo e quindi il salto termico è piccolo per cui non riusciamo ad ottenere un risparmio economico.

Per produrre 1 kg di biomassa servono 1-1.2 kg n-alcani e 2.2 kg O₂.

Processo che ha senso quando si vuole abbattere la carica degli idrocarburi delle correnti da trattare.

4) Processo *Pekilo*, usato in Finlandia, deriva dagli scarti dell'industria di legno.

Si utilizzano scarti lignocellulosici pretrattati da un fungo in grado di degradare la cellulosa. Vanno considerati i costi del pretrattamento. Produzione di questo SCP diventa conveniente perché sottoprodotto di un processo che ha scopi diversi, è un processo continuo che è in grado di produrre circa 10000 ton/anno con contenuto proteico al 59%.

5) Altro processo che ha obiettivo di nuovo trattamento scarto e poi genera come sottoprodotto un SCP è quello che parte dall'industria casearia e in particolare dalla *degradazione del siero di latte*.

Vengono usati microrganismi diversi che danno luogo a condizioni operative diverse.

Produzioni non molto piccole, organismi usati principalmente a scopo alimentazione.

Si alimenta il siero, si fa un po' di pretrattamento del siero per abbattere la carica proteica, le proteine del siero possono essere separate a priori e poi essere vendute così come tali. Il siero va poi ad un bioreattore in cui avviene la reazione con gli organismi e poi dà luogo al liquame e alla produzione di lievito.

6) Processo *BEL* usato in Francia, serve a degradare gli scarti dell'industria casearia con produzione non piccola di SCP. Viene effettuato un pretrattamento e una pastorizzazione per separare il 75% delle proteine tramite una precipitazione. Si forma come SCP il protibel con applicazioni cibo e mangime.

Nella produzione della SCP quello che si preferisce è usare un processo di tipo aerobio per poter ottenere elevate rese in biomassa. Il motivo è che durante il processo aerobio si genera più ATP rispetto alla crescita anaerobia.

Non è vero che l'utilizzazione di via anaerobia è fortemente inibita dal fatto che il prodotto finale è etanolo dando così bassi coefficienti di resa perché questo dipende molto dal batterio.

I lieviti sono organismi aerobi facoltativi quindi sui lieviti questo tipo di ragionamento ha senso.

La via anaerobia è di per sé meno efficiente proprio perché porta a produzione di ATP più bassa.

Il fatto che ci sia minore resa non dipende dalla produzione dell'etanolo ma proprio dalla quantità di ATP prodotta.

La scelta anaerobia utilizza la via glicolitica che porta a più energia e utilizza la via dei pentosi, anche qui abbiamo una resa elevata, ma la resa dipende sempre dal microorganismo (meglio fare Krebs).

In presenza di via aerobia il lievito per definizione non produce etanolo durante la crescita ma sceglie Krebs.

La via aerobia quando utilizziamo organismi aerobi facoltativi in realtà può portare a produzione di etanolo quando siamo in presenza di eccesso di zucchero.

Il microorganismo aerobio cresce aerobio, trasforma il substrato in CO_2 , acqua e se stesso, crescerà quindi in alte rese e ad alte velocità. Produrrà un grande numero di ATP quindi crescita più efficiente.

Un microorganismo anaerobio, qualunque sia la via che sceglierà, l'unica produzione di ATP che riesce ad effettuare è quella che deriva dalla via glicolitica (che è comune a TUTTI) quindi ne avrà meno rispetto ai microrganismi aerobi.

I microrganismi aerobi facoltativi tra cui troviamo i lieviti (i più usati per fare SCP) e in particolare il *Saccharomyces*, usato come prodotto SCP perché contiene proteine, può essere usato come lievito per panificazione e usato come lievito per produzione di etanolo, ha una caratteristica: collo di bottiglia respiratorio.

L'organismo sarà in grado in funzione delle sue velocità enzimatiche e del suo metabolismo di degradare una certa quantità di zuccheri, posto che gli sia fornito l'ossigeno; ma ci sarà un limite che sarà proprio dell'organismo stesso e al di là di quel valore il glucosio non potrà essere degradato in via aerobia anche se presente.

C'è un rapporto caratteristico per avere la massima resa in un processo aerobio che dipende dalla fisiologia dell'organismo. Quel lievito in particolare anche se ne mettiamo un po' di più non sarà in grado di degradarlo.

Ci sarà una massima velocità di crescita per via aerobia che non potrà essere superata.

Il microorganismo però non spreca nulla quindi un facoltativo sfrutta il glucosio per crescere in proporzione alla sua capacità respiratoria e quindi in funzione della sua fisiologia, se forniamo eccesso di zucchero questo viene fermentato anaerobio. Nel caso del *Saccharomyces* se stiamo facendo fermentazione aerobia con obiettivo crescita del microorganismo dobbiamo fare attenzione alla concentrazione di zucchero nel substrato perché se eccediamo la capacità respiratoria cioè la capacità di zucchero respirabile dall'organismo (che dipende dalla sua fisiologia e dalla velocità degli enzimi) a quel punto l'eccesso di zucchero dai lieviti presenti verrà fermentato ad etanolo.

Per cui abbiamo produzione di etanolo che non vogliamo perché deleterio per la biomassa che stiamo crescendo (etanolo prodotto inibitorio dell'organismo). Il rischio dell'ipossia è molto grande, è difficile controllare ossigeno.

Per cui per la produzione di etanolo si fa una fermentazione che è teoricamente anaerobia cioè fermentazione alcolica in presenza di ossigeno ma in eccesso di glucosio in modo tale che l'eccesso possa essere trasformato in etanolo.

Lavoriamo comunque in condizioni di ossigeno perché si mantiene costante la biomassa per un tempo ragionevole.

La produzione di etanolo porta a un prodotto inibitorio che uccide l'organismo.

La presenza di etanolo c'è soltanto nel momento in cui siamo in eccesso di glucosio → bisogna stare attenti all'eccesso di zucchero.

Produzione SCP attuale: QUORN.

Principalmente prodotto in Inghilterra, ha come mercato la popolazione vegetariana, vegana e chi ha problemi di colesterolo. Il QUORN è un fungo, è un *Fusarium*, viene prodotto attraverso una fermentazione sommersa di circa 6h e cresciuto in condizione altamente aerobie, viene compresso, separato, trasformato e venduto come nutriente.

Fermentazione continua con reattori air-lift e fatta ripartire dopo circa 1000 h di esercizio.

Fermentazione a base di glucosio, parte da substrato di amidi che derivano da scarti di mais, pH tra 4.5-7, contiene ferro, manganese, biotina (vitamina che aiuta la crescita).

Una volta recuperato il fungo tramite centrifugazione viene addizionato con una serie di aromatizzanti e sostanze di vario tipo in modo da ottenere una simil-carne. Siccome contiene una grande quantità di RNA questo deve essere abbattuto e lo si fa per abbattimento a 64°C perché a T più elevate andrebbero a degradarsi le proteine contenenti nel prodotto. Ha un buon contenuto di proteine, basso contenuto di grasso e un po' di fibre.

A seconda di come lo si trasforma può assumere diversi prodotti ad esempio se aggiungo albume d'uovo diventa simile ad una cotoletta di pollo.

La riformulazione una volta effettuata la produzione è più legata al conferire gusto e aspetto un po' più appetibile.

Il QUORN è stato approvato dal 1985 a scopo alimentazione umana perché è commestibile.

Siccome è un fungo filamentoso si cerca di evitare di rompere le ife.

Il processo *Pruteen* fu pensato con obiettivo utilizzo metano per produzione SCP per alimentazione umana.

Il metano come fonte di C per la produzione di SCP ha dei limiti: a T e P normali ha una bassa solubilità in acqua limitando produttività e resa, è potenzialmente esplosivo se miscelato con aria ed è un gas relativamente difficile da immagazzinare e trasportare.

Esistono però dei microrganismi in grado di utilizzare metano come fonte di C e di energia come i *Pseudomonas* e i *Methylomonas*; è facile da ottenere in forma pura e non è tossico per alcuni microrganismi.

Il metano è ossidato a metanolo e poi a formaldeide, che è molto tossica e non è un substrato adatto alla crescita dei microrganismi. Cerco allora di modificare il substrato e di renderlo più accessibile agli organismi.

Una volta trovata la modifica studio come i microrganismi reagiscono a questo substrato nuovo in laboratorio. Poi faccio uno scale up con il design del reattore considerano determinati parametri come portata, minimo OTR, evoluzione del calore e concentrazione di metanolo richiesta nel mezzo per supportare la biomassa.

Il fermentatore tipo air-lift fu proprio progettato e pensato per questo tipo di produzione.

Bolle né troppo grandi (producono uno scambio di gas inefficiente) né troppo piccole (non riescono a fondersi nella parte del riser).

Processo continuo, manca un po' di tracciabilità, ma non è un problema in quanto il prodotto ottenuto non è consumato, come si voleva all'inizio, ma viene prodotto a scopo estrattivo.

Degradiamo quindi il prodotto estraendo proteine o amminoacidi.

Air lift vs CSTR

Gli air-lift consentono migliori OTR e efficienza di energia migliore perché il trasferimento di ossigeno è favorito dall'elevata pressione idrostatica generata alla base del fermentatore.

I reattori agitati richiedono guarnizioni asettiche finemente progettate sui cuscinetti dell'albero che richiedono manutenzione. Più grande è il bioreattore e maggiore è il problema. I reattori air-lift non hanno queste parti mobili. È più facile operare su larga scala grazie a flussi definiti e controllabili, fattori come OTR e trasferimento di calore sono più facili da organizzare a larga scala.

Gli air-lift non forniscono una distribuzione uniforme dei nutrienti. Se l'aria e le sostanze nutritive vengono introdotte in un unico punto, la concentrazione di O_2 , CO_2 , altre sostanze nutritive e anche la P idrostatica cambiano in modo ciclico mentre il fluido scorre intorno al reattore.

LIEVITI

I lieviti sono organismi eterotrofi molto comuni, aerobi facoltativi. Generalmente sono funghi unicellulari, eucarioti. Richiedono substrati semplici, non esclusivamente il glucosio.

Industrialmente il più utilizzato è il *Saccharomyces cerevisiae* che costa poco e assicura una buona crescita, è utilizzato per aumentare la morbidezza e la crescita del pane.

Il *saccharomyces* produce ATP via Krebs convertendo monosaccaridi in CO_2 e acqua.

I lieviti vengono usati per bevande alcoliche, pane, SCP, produzione di insulina ecc.

Sono generalmente non patogeni tuttavia troviamo alcuni esemplari che causano meningite oppure che infettano la pelle e le mucose.

Possono riprodursi per divisione asessuata o sessuata a seconda delle condizioni in cui si trovano.

Costituiscono i microrganismi più prodotti in termini di peso.

Li distinguiamo in 3 categorie: alimentari, mangimi e alcolici.

I lieviti alimentari sono *saccharomyces* e *candida*. La *candida* è il lievito più versatile, utilizza una grande gamma di fonti di C e N. I lieviti per mangimi sono gli stessi dei lieviti alimentari, l'unica differenza è che vengono imposti standard meno rigidi per la produzione di lieviti per mangimi. I lieviti alcolici sono utilizzati per la produzione di birra e distillati; i lieviti alcolici sono ceppi appositamente selezionati a seconda se vogliamo produrre birra, vino o distillati.

La grande richiesta di lievito necessaria per il pane e per i prodotti da forno è soddisfatta alla fermentazione.

Il primo metodo di produzione commerciale del *saccharomyces* è stato quello della scrematura in cui si utilizzavano dei substrati derivanti dai chicchi di cereali ed era simile ai processi di fermentazione della birra e della distillazione.

Il lievito galleggiava sulla sommità della fermentazione e dopo essere stato scremato veniva lavato e pressato.

Durante la prima guerra mondiale a causa della carenza di cereali l'industria del lievito ha trovato substrati alternativi, per esempio in Germania si sviluppò un processo in cui melassa, ammoniaca e sali di ammonio venivano usati proprio come substrato.

A causa di due nuovi sviluppi la resa di produzione del lievito è aumentata dal 3% a metà del 19 secolo all'13% all'inizio di questo secolo fino all'attuale resa di oltre il 50%.

Il primo sviluppo riguarda il metodo Zulauf in cui al posto di fare un processo batch si fa un processo fed-batch oppure aggiungo pian piano i nutrienti. Questo modo è utilizzato nella produzione del lievito di panificazione e garantisce che l'eccesso di zucchero della melassa non venga fermentato per la produzione di alcol.

Il secondo sviluppo invece riguarda la produzione di lievito attivo essiccato per fornire lievito alle terre lontane, al posto del lievito normalmente compresso utilizzato nei paesi temperati.

Dato che i *Saccharomyces* tendono a mutare ho bisogno di una corretta conservazione.

Tra i vari metodi, i più utilizzati sono la conservazione in azoto liquido e il metodo della cultura dell'olio in cui olio sterile viene posto su del lievito e refrigerato a 4°C.

La liofilizzazione non è molto utilizzata in quanto induce perdita di vitalità in molti lieviti e tendenza alla mutazione.

La produzione del lievito di panificazione inizia con la propagazione dello starter, poi le cellule vengono trasferite in piccole fiasche di coltura, in seguito in recipienti intermedi più grandi e infine nei fermentatori di produzione.

Il mezzo per la fermentazione di produzione normalmente contiene melassa come fonte di C ed energia, che può essere pretrattata con acido per rimuovere i solfuri e riscaldata per far precipitare le proteine.

La melassa è spesso carente di alcuni amminoacidi e di solito sono necessari integratori di biotina e acido pantotenico.

È una fermentazione aerobia, questo favorisce un'elevata resa in biomassa in quanto il 50% del C disponibile può potenzialmente essere convertito in biomassa → obiettivo mantenere cellule in condizioni aerobie.

Sono stati sviluppati ceppi di lievito moderno (per fare l'impasto a rapida lievitazione) con le seguenti proprietà:

capacità di crescere rapidamente a T ambiente, capacità di produrre grandi quantità di CO₂ nell'impasto di farina piuttosto che alcol, buona qualità di conservazione cioè capacità di resistere all'autolisi se conservato a 20°C, attività glicolitica ad alto potenziale, capacità di adattarsi rapidamente a substrati mutevoli, capacità di sintetizzare enzimi in condizioni anaerobie dell'impasto e elevata competitività cioè elevata resa in termini di peso secco per unità di substrato utilizzato.

I lieviti sono aerobi facoltativi, l'O₂ e il C determinano la via metabolica.

Il collo di bottiglia respiratorio ci dice che se lo zucchero presente supera la capacità respiratoria, parte di esso sarà degradato per via anaerobia in etanolo. La crescita aerobia è ottenuta mediante una forte aerazione del brodo di fermentazione che di solito viene ulteriormente aumentata con il progredire della fermentazione stessa.

La fermentazione viene eseguita come processo fed-batch e i nutrienti vengono aggiunti ad una velocità specifica per prevenire l'azione dell'effetto Crabtree ossia quel fenomeno in cui il substrato sopprime la respirazione aerobia.

Questo regime limita il metabolismo anaerobio e la produzione di etanolo, che altrimenti comporterebbe una minore resa di biomassa.

Non viene usato un fermentatore agitato a causa dell'elevata energia iniziale e dei costi operativi. Generalmente i reattori di lievito vengono aerati solo dagli spargers (bubble column).

L'aerazione viene avviata immediatamente, vengono miscelati acqua, nutrienti minerali, lieviti e melassa miscelata contenente glucosio. La quantità di melassa miscelata è calcolata in modo che lo zucchero totale nei fermentatori non superi lo 0.1% e l'O₂ non deve scendere sotto 0.2 ppm (condizioni anaerobie),

pH mantenuto a 4-5 mediante l'aggiunta di alcali. Tempo di fermentazione 10-20 h.

Il brodo di fermentazione al termine del processo viene raffreddato e le cellule concentrate in separatori centrifughi, quindi vengono lavate per risospensione in acqua e centrifugazione fino a quando non sono di colore più chiaro.

Il contenuto delle cellule viene concentrato ulteriormente da un filtro a tamburo rotante.

Alla fine della fase di crescita, quando tutti i nutrienti sono esauriti, l'aerazione viene proseguita per altri 30 min per maturare il lievito; ciò incoraggia la produzione di carboidrato di riserva, riduce la sintesi di proteine e RNA e stabilizza le cellule per una maggiore durata di conservazione.

Il lievito viene conservato in frigorifero o altrimenti se molto essiccato può essere conservato per lunghi periodi senza refrigerazione. Complessivamente il ciclo delle operazioni dura circa 2 settimane.

Gli ingredienti chiave nella produzione del pane sono: grano, acqua, sale e un agente lievitante.

A volte zucchero, grasso o uova sono tra i componenti aggiuntivi, mentre gli acidi vengono utilizzati nella produzione del pane di segale. La ritenzione di gas negli impasti di grano dipende dalla struttura del glutine.

Produzione pane: preparazione delle materie prime, fermentazione e mescolamento dell'impasto, lavorazione della pasta (fermentazione, lievitazione, spezzatura e formatura), cottura e trattamenti finali come affettatura e confezionamento.

Lo zucchero viene aggiunto per fornire C ai lieviti, per addolcire il pane e permette una più rapida doratura della crosta. Il latte viene aggiunto per rendere più nutriente il pane e per migliorare il colore della crosta.

L'acqua è necessaria per formare il glutine, per consentire il rigonfiamento dell'amido e per fornire un mezzo per le varie reazioni che avvengono nella formazione dell'impasto.

I grassi vengono aggiunti come grasso di cottura nella panificazione a circa il 3% (p/p) della farina per ottenere una dimensione maggiore della pagnotta, unna mollica più tenera e proprietà di affettamento migliorate.

Il burro si usa solo nei pani più costosi; si può usare lo strutto e i grassi vegetali sono ormai comuni.

La farina è l'ingrediente principale del pane e si ottiene dalla macinazione dei chicchi di varie specie e varietà di grano.

Le proteine insolubili che contiene sono note come glutine. Il glutine ha la proprietà unica di formare una struttura elastica se inumidito con acqua.

Il principale agente lievitante è il lievito. Le colture di lievito madre comprendono tipicamente batteri e lieviti, i lattobacilli sono prevalenti.

Durante la panificazione devono essere presenti enzimi amilolitici sufficienti per scomporre l'amido della farina in zucchero. Le lipasi hanno un effetto rinforzante del glutine che si traduce in un impasto più stabile e una migliore qualità del pane.

Il sale migliora il gusto, stabilizza la fermentazione del lievito e ritarda l'attività proteolitica.

Lievito per birra

Per la produzione di birra si usa il *saccharomyces cervisiae* o il *saccharomyces bayanus*.

I ricercatori hanno selezionati ceppi specifici per la produzione di birra, vino, liquori ed etanolo industriale.

I vari ceppi di lievito per birra hanno caratteristiche specifiche per adattarsi a determinati substrati (frutta, uva, cereali, barbabietola, malto), esaltare particolari aromi nei prodotti finiti, adattarsi a determinate T, sopportare gradazioni alcoliche più o meno elevate, ecc.

Nelle condizioni anaerobiche i lieviti sono in grado di ripristinare NAD^+ mediante trasferimento di elettroni ad una molecola organica: acetaldeide e etanolo sono i prodotti finali.

Il problema è che il contenuto di etanolo superiore al 12-14% non può essere tollerato.

Ossigeno, acidi grassi e steroli sono però in grado di ostacolare gli effetti dell'etanolo sulla membrana cellulare.

La fermentazione deve avvenire a secco ad alte velocità, bisogna avere una buona tolleranza a etanolo, T e SO_2 , resistenza anche ad altri microrganismi.

La fermentazione può essere effettuata anche in eccesso di zucchero: l'eccesso rispetto alla capacità respiratoria si trasforma in etanolo.

Birra: i suoi ingredienti di base sono malto d'orzo, acqua, luppolo e lievito. Ha un contenuto alcolico relativamente basso. Solo una piccolissima porzione di un chicco d'orzo può essere estratta e fermentata dal lievito.

L'orzo viene maltato per rendere il chicco più solubile e facilmente fermentabile dai lieviti. L'amido di malto nell'orzo è racchiuso in una parete cellulare e gli involucri vengono strappati via durante il processo di maltazione.

La rimozione della parete cellulare ammorbidisce il grano e lo rende più facilmente macinabile.

Nel birrifico il grano maltato deve essere prima macinato per produrre particelle relativamente fini, che sono per la maggior parte amido. Le particelle vengono poi miscelate con acqua calda, che deve contenere il giusto contenuto di sali, nel processo di ammostamento.

La parte liquida del mosto, il wort, è filtrato per esempio attraverso piastre filtranti a membrana. Il mosto viene poi portato al bollitore. L'ebollizione serve alla sterilizzazione del mosto, alla precipitazione delle proteine che potrebbero causare intorbidamento e all'allontanamento dei granuli dell'orzo. Viene aggiunto una parte del luppolo.

Dopo che il precipitato prodotto è stato rimosso, il mosto luppolato viene raffreddato e addizionato al lievito.

Il luppolo ha due componenti principali: resine e oli essenziali. Le resine conferiscono l'amaro alla birra.

Il lievito di birra può essere suddiviso in ceppi ALE e LAGER: il primo si raccoglie sulla superficie del mosto in fermentazione e il secondo si deposita sul fondo di una fermentazione.

Entrambi i tipi hanno bisogno di un po' di ossigeno per innescare il loro metabolismo, ma per il resto la fermentazione alcolica è anaerobia. Le fermentazioni ALE sono generalmente completate in pochi giorni a T fino a 20 °C, mentre le fermentazioni LAGER fino a 6 °C possono richiedere diverse settimane. La fermentazione è completa quando è stata raggiunta la gradazione alcolica desiderata. Il lievito viene raccolto per essere utilizzato nella fermentazione successiva. La maggior parte delle birre, sia ale che lager, riceve un periodo di condizionamento relativamente breve dopo la fermentazione e prima della filtrazione. Questo condizionamento viene eseguito a -1 °C o meno (ma non così basso da congelare la birra) in genere per tre giorni, condizioni in cui più proteine escono dalla soluzione, rendendo meno probabile che la birra diventi torbida nella confezione o vetro. La birra filtrata viene regolata alla carbonatazione richiesta prima del confezionamento in lattine, fusti o bottiglie di vetro o plastica.

SEMINARI

Prof Seneci

Un prodotto naturale è una molecola sintetizzata attraverso reazioni chimiche che sono divise in reazioni naturali che portano alla biosintesi e reazioni artificiali.

NP (prodotto naturale) è biosintetizzato attraverso il suo metabolismo.

Reazioni metaboliche fondamentali per gli organismi, servono per far crescere, vivere e far compiere delle azioni all'organismo.

Ogni organismo sintetizza tutti i building blocks ossia i mattoncini che gli servono per costruirsi → metaboliti primari

Ci sono anche degli scopi meno evidenti per cui gli organismi biosintetizzano delle molecole: gli insetti per l'accoppiamento secernano alcune molecole/ormoni affinché l'altro sesso senta questi odori e poi venga effettuato l'accoppiamento, per difesa passiva ad esempio il camaleonte riesce a mimetizzarsi, per attacco e la protezione per esempio ci sono gli animali che secernano veleno.

La natura e l'evoluzione provvede a dei miglioramenti degli animali affinché possano vivere meglio nei loro ambienti.

Prodotti naturali fatti attraverso reazioni chimiche, si usano i catalizzatori e quelli migliori sono i biocatalizzatori ossia gli enzimi perché regiospecifici, permettono di far reagire solo i gruppi che ci interessano.

L'organismo trova beneficio dall'aver sintetizzato queste molecole.

La medicina tradizionale era molto importante nel passato perché, non avendo la nostra conoscenza né le nostre tecnologie, era l'unico modo per alleviare determinati dolori.

Tutt'ora è molto importante perché esistono ancora prodotti naturali non ancora mappati e studiati come le foreste tropicali.

Prof. Callegari

Produzione di alta qualità ma con qualità costante. Il formaggio è il prodotto solido ottenuto dalla coagulazione del latte, scremato in seguito a coagulazione presamica o acida con aggiunte di batteri lattici, cloruro di sodio e spezie. Il caglio è un estratto del quarto stomaco di vitelli, agnelli o capretti lattanti; hanno l'enzima proteolitico, che è la chimosina o rennina fondamentale per la coagulazione del latte, destabilizza la caseina.

Coagulazione presamica: la caseina resta in soluzione nell'acido grazie ad un glicopeptide e resta così fino a quando non arriva il caglio ad eliminarlo, allontanandolo la caseina perde la solubilità e si forma il para-fosfocaseinato di calcio che consente alla caseina di precipitare aggregandosi. Il reticolo si contrae provocando la sineresi.

Coagulazione acida: caseina destabilizzata perdendo le cariche esterne, diventa neutra e precipita. Questo impasto trattiene il siero e non ha la capacità di fare sineresi. Mozzarella.

Nei formaggi abbiamo combinazione di coagulazione presamica e acida assieme perché usiamo batteri in grado di acidificare.

In base all'umidità del formaggio abbiamo pasta molle, semidura e dura come il grana.

In base al contenuto in grasso abbiamo formaggi magri, semigrassi e grassi come il gorgonzola.

Il latte arriva, il grasso viene lasciato affiorare (in genere 1 notte) e il grasso viene allontanato e andrà nella destinazione del burro. Nella produzione del grana l'affioramento del grasso è fondamentale perché riduce la carica microbica iniziale; questa può influire tantissimo sulla produzione e sulla qualità finale del prodotto.

Il latte scremato entra in caldaia, comincia ad essere scaldato, voglio ottenere la coagulazione e dopodiché aggiungo

l'innesto. L'innesto del grana è un sieroinnesto ossia una coltura che sviluppando nel siero della lavorazione precedente. I formaggi possono essere fatti anche con il lattoinnesto.

A spostare gli equilibri dei fermenti si sposta completamente il risultato finale.

Metto i fermenti nella caldaia dove ho il latte, latte depauperato dai batteri, faccio inoculo e faccio fermentazione. Devo essere sicura di selezionare i batteri caseari e per fare ciò alto alla T, faccio scendere poi la T e ho progressiva crescita dei batteri lattici.

Fatta la coagulazione, devo rompere la cagliata lo spino (uno strumento) in piccoli frammenti. La dimensione del granulo dipende dal tipo di spino e dal tipo di formaggio. La rottura determina lo spurgo della cagliata.

Estrazione della cagliata, formatura e salatura (salatura a secco, in salamoia o della cagliata).

In base alla cottura della cagliata ho pasta cruda (come il gorgonzola perché prima partiva dal latte crudo e non veniva cotto ora invece viene termizzato per motivi di sicurezza), semicotta e cotta.

In base al tempo di stagionatura: formaggio fresco, a breve stagionatura (maturazione 15-60 giorni), a media stagionatura (60-180 giorni) e formaggio a lunga stagionatura (dopo 180 giorni) come il Grana Padano.

Fermentazioni con produzione di acido lattico e altri composti.

Fase di maturazione: azione di enzimi (autolisi e rilascio enzimi intracellulari)

Prof Rossi

Organismi geneticamente modificati.

Domesticazione delle piante: selezione operata dall'uomo su un certo numero di specie vegetali giudicate più utili rispetto alla masse delle piante selvatiche, quando è iniziata l'agricoltura.

Raccolta preferenziale di esemplari che presentavano caratteristiche vantaggiose (come assenza di spine o spighe più grandi).

La legge dice che l'OGM è un organismo il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale.

I mutanti sono quei prodotti geneticamente modificati ottenuti grazie all'esposizione delle piante a radiazioni.

I campi gamma sono terrazzamenti concentrici in cui al centro ci sono fonte di radiazioni, venivano coltivate varie specie di piante, si faceva avviare la radiazione e si notavano i mutanti.

Con questo approccio si sono ottenuti delle mutazioni interessanti come pompelmo rosa o il grano creso, utilizzato per la produzione della pasta ed è tra le 5 varietà più coltivate al mondo.

Gli OGM non sono solo piante, si intendono tutti gli organismi geneticamente modificati come l'insulina. Scoperta rivoluzionaria. Un tempo si otteneva o dal maiale o dai cadaveri, è un ormone che viene prodotto dai pancreas.

Piante di 1 generazione, arricchite di nuovi geni che sono codificanti per delle proteine che migliorano il livello produttivo rendendole resistenti agli stress abiotici o biotici. I primi sono freddo, caldo, salinità mentre i secondi sono virus, batteri, insetti.

Seconda generazione sono piante migliorate ad esempio per i valori nutrizionali oppure possono essere ingegnerizzate e diventano sistemi per produzione di molecole farmaceutiche o enzimi → pianta può diventare un bioreattore.

Ingegnerizzo le piante tramite la tecnologia del DNA ricombinante. Questa tecnologia consente di trasferire geni da un organismo ad un altro sfruttando la caratteristica universalità del codice genetico.

Due metodi: 1) agroinfezione, l'agrobacterium è richiamato dalle molecole che si sviluppano in seguito alle lesioni delle piante e trasferisce parte del suo genoma nelle piante. Presenza di un promotore che fa sì che la proteina si esprima in un punto.

2) metodo biolistico, metodo meccanico in cui il DNA esogeno, quello che voglio trasferire sulla pianta, viene fatto essiccare su delle micro particelle di oro e tungsteno che vengono sparate alle piante che sono poste al di sotto. Si preferisce usare il primo metodo.

Il primo prodotto commercializzato a uso umano è stato il pomodoro Flavr savr, il pomodoro ha solitamente una vita ridotta perché diventa molle e quindi lavorarono proprio su questa caratteristica. Uscì dal mercato dopo qualche anno perché scelsero un pomodoro con caratteristiche organolettiche non particolarmente buone.

Un altro esempio di OGM sono le piante tolleranti agli erbicidi; l'impiego di erbicidi è considerato insostituibile negli allevamenti intensivi.

Vantaggi: ridurre i trattamenti con gli erbicidi e si riduce anche il carburante destinato ai diserbanti.

Esempio; Il glifosato era un erbicida molto antico ed è caduto in disuso per molti anni per via della bassa selettività, è stato riscoperto negli anni 2000 in seguito alla sua associazione con gli OGM, ora è l'erbicida più usato al mondo, ma anche in posti dove non si fa OGM.

Lo IARC (agenzia internazionale per la ricerca del cancro) ha classificato il glifosato come probabile cancerogeno dell'uomo perché è stato notato un lieve incremento di linfomi non Hodgkin.

Il rischio però è correlato all'esposizione. Sia EFSA che ECHA hanno poi dichiarato che non è un problema ma sono stati stabiliti dei residui massimi per ogni prodotto.

Un secondo gruppo di OGM sono quelli vivi → tecnologia BT.

Questa tecnologia si pone di risolvere il problema della piralide che sono insetti che depongono uova sui mais, dalle uova escono delle larve che scavano dei tunnel nel fusto di cui si nutrono indebolendo la pianta e sviluppando anche tossine. Il *Bacillus thuringiensis* è un insetticida biologico contro la piralide, il suo gene è stato inserito nella pianta del mais rendendolo più resistente.

Piante di seconda generazione

Aumenta popolazione, sup agricola non può aumentare e manca acqua → OGM utili per la sostenibilità.

Il gene CBF conferisce tolleranza alla carenza di acqua e quindi più resistenti allo stress idrico.

Un esempio di piante di seconda generazione è il golden rice, ha all'interno il beta-carotene, è stato progettato per coprire il 50% del fabbisogno giornaliero di vitamina A.

Il biologico richiede la diminuzione del chimico così come gli OGM.

Gli OGM più diffusi sono soia, mais, cotone e colza.

La soia OGM è circa il 77% di quella prodotta mentre nel mais è solitamente molto meno, 32% perché il mais è molto prodotto localmente (soia compiamo mais coltiviamo).

In Europa gli OGM vengono autorizzati dopo una valutazione dall'EFSA di un dossier, una volta ottenuta l'autorizzazione questa vale 10 anni dopodiché bisogna richiedere il rinnovo, il monitoraggio dell'OGM è a vita.

Bisogna dimostrare l'equivalenza sostanziale, la composizione nutrizionale tra l'OGM e quello non modificato deve essere molto simile.

Pianta diventa bioreattore.

Piante producono molecole di ambito farmaceutico. Vantaggi: sono organismi eucarioti che possono produrre molecole che derivano da altri organismi eucarioti, non esistono patogeni comuni tra mondo animale e mondo vegetale, non richiedono troppa necessità nell'ambito di coltivazione (terra, sali minerali, acqua e luce).

Una possibile applicazione sono i vaccini edibili, piante transgeniche che esprimono nei loro tessuti edibili parti di microrganismi (antigeni) in grado di indurre una risposta immunitaria specifica (mucosale) nell'animale dopo somministrazione orale.